

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências

Departamento de Química e Bioquímica



**A Bioactividade do Xarope de *Aloé Barbadensis* Miller – Uma Antiga Receita de
Frades Franciscanos**

Liliana Marília Lage da Silva

Dissertação
Mestrado em Química
Especialização em Química, Saúde e Nutrição

2013

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências

Departamento de Química e Bioquímica



A Bioactividade do Xarope de *Aloé Barbadensis* Miller – Uma Antiga Receita de Frades Franciscanos

Liliana Marília Lage da Silva

Dissertação
Mestrado em Química
Especialização em Química, Saúde e Nutrição

Orientadores: Professora Doutora Maria Eduarda Araújo

2013

O trabalho experimental para a elaboração desta dissertação de mestrado foi realizado no Grupo da Química dos Glúcidos do Centro de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

Agradeço ao meu pilar que é a minha família. Ao meu pai, que antes de partir, me disse que deveria investir no meu crescimento profissional e que se o mestrado era bom para mim, que deveria continuar. Obrigada pai por acreditares em mim, por me plantares o bichinho da ciência. Do muito que sou, devo a ti. Agradeço à minha mãe que me apoiou este tempo todo e tanta força me deu. Pela compreensão, afecto e acreditar sempre nas minhas capacidades este anos todos. Farei sempre tudo para não vos desiludir. Ao meu irmão, Ricardo Silva, e à minha cunhada Sara Morgado que me incentivaram sempre, com alento e palavras de carinho. Obrigada à minha avó, que mesmo com uma idade avançada, sempre me perguntou como estava a correr o meu trabalho. Obrigada por te preocupares sempre comigo e pelo teu carinho. Ao meu avô, o meu ídolo, obrigada pela tua ternura e amor incondicional. Sabes que esta tese é por nós os dois. Que as estrelas do Universo iluminem a tua alma e a do pai.

Não poderei deixar de agradecer a um ser maravilhoso, de quatro patas mas cheio de alma que adormeceu tantas vezes aos meus pés enquanto eu estudava ou escrevia. Pelo teu carinho doce e protector, como o de um verdadeiro cão, a ti meu querido Nyoko, obrigada!

Às amigas, Sílvia Cunha, Marisa Pinto, Andreia Ferreira, Olívia Ramos, Natacha Martins, Sílvia Oliveira e Mónica Horta, pelo vosso apoio e força, o meu sincero obrigada. Às colegas Ana Amélia, Cátia Évora, Daniela Batista e Sónia Girante por trabalharem comigo durante estes anos e pela vossa amizade.

Obrigada à Prof. Dr.^a Beatriz Mendes Borba, pela sua amizade, partilha de conhecimento e disponibilidade. Obrigada à Prof. Dr.^a Margarida Meireles pela sua delicada atenção e por contribuir para alguns experimentos da minha tese. Obrigada à colega Lina Falcão por me ajudar e partilhar o seu saber comigo. Obrigada a todos os meus professores da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa por alargarem os horizontes do meu conhecimento.

A todos os meus amigos e colegas de faculdade que não mencionei, por serem muitos, mas que sabem quem são, o meu obrigada pela partilha de conhecimentos e alegrias. A todos os outros amigos, aqueles com quem me tenho cruzado pela vida fora, obrigada pelo vosso

apoio, incentivo, palavras de carinho para que concluísse a tese. Obrigada por acreditarem em mim. Vocês sabem quem são.

E agradeço à minha Professora-Orientadora Dr.^a Eduarda Araújo, por me ajudar a descobrir o mundo fantástico da Química dos Produtos Naturais, com quem aprendi tanto. Obrigada pelo seu incentivo, força e partilha de sabedoria.

Em suma, obrigada, do fundo do meu coração, a todos aqueles que acreditaram em mim.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Sir Isaac Newton

Resumo

Na medicina tradicional acredita-se que uma antiga receita de um xarope de Frades Franciscanos demonstra melhorias em patologias inflamatórias. Este xarope é como um remédio caseiro, habitualmente utilizado em Portugal e no Brasil. Na verdade, esta receita foi trazida pelo Frei Romano Zago, que nasceu em Agosto de 1932, no Brasil, espalhando a receita por vários países, incluindo Portugal. O xarope consiste em folhas de *Aloe barbadensis* Miller, mel e aguardente.

Sabe-se que a planta tem actividade anti-inflamatória, actividade anticancerígena e actividade antioxidante, tal como o mel e o aguardente. No entanto, realiza-se o estudo da bioactividade deste xarope para verificar se as referidas melhorias não são apenas efeito placebo. Por isso, neste trabalho apresentamos:

- A avaliação da actividade antioxidante do xarope através dos testes de inibição do DPPH e do β -caroteno/ácido linoleico;
- Inibição da redução do ferro(III) a ferro(II);
- Teste da ctividade quelante do ferro(II);
- Determinação de compostos fenólicos totais;
- Inibição do enzima α -glicosidase;
- Inibição do enzima COX-1;
- A viabilidade celular para células do carcinoma mamário em linhas tumorais MCF7.

Em seguida, procurou-se identificar o composto responsável pela actividade antioxidante, após isolamento por TLC preparativa. Uma tentativa de identificação deste composto foi baseada em FTIR e RMN de ^1H e ^{13}C .

Abstract

In folk medicine it is believed that an old recipe of Franciscans Friars syrup demonstrate an improvement of inflammatory pathologies. This syrup is like a home remedy, widely used in Portugal and Brazil. In fact, this recipe was brought by the Friar Romano Zago, who was born in Brazil in August of 1932, and spread the recipe in some countries, including Portugal. The syrup consists of *Aloe barbadensis* Miller leaves, honey and brandy. The plant has anti-inflammatory and anticancer activity, as well as antioxidant activity, like honey and brandy. However, we carried out the study of the bioactivity of the syrup to verify that these improvements are not only placebo effect. Therefore, in this work, we present:

- the evaluation of the antioxidant activity of the syrup by the DPPH and the β -carotene/linoleic acid bleaching inhibition tests;
- the inhibition of reduction of iron(III) to iron(II);
- the metal chelating activity;
- the determination of total phenolic content;
- the α -glucosidase inhibition;
- the COX-1 inhibition;
- the cellular viability for MCF7 human breast cancer cell line.

Then, it was tried to identify the compound responsible for the antioxidant activity after isolation by preparative TLC. An attempt identification of this compound was based on a FTIR and ^1H and ^{13}C NMR spectra.

Objectivo

Actualmente verifica-se na sociedade ocidental uma grande curiosidade e grande aceitação pelas medicinas naturais. O xarope de *Aloé vera* (*A. vera*), de mel e aguardente, é recomendado para o tratamento do cancro da mama, da próstata e do intestino. Contudo, apesar de o *A. vera* ser uma planta de reputada bioactividade, a eficácia deste xarope ainda não foi comprovada cientificamente, ficando os efeitos descritos, considerados efeito placebo. Neste trabalho propôs-se a realização, através de testes químicos *in vitro*, de uma primeira avaliação sobre a sua actividade antioxidante e anti-inflamatória que suporte a sua alegada acção benéfica.

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vii
Abstract	viii
Objectivo	ix
Índice de Anexos	xiv
Índice de Tabelas	xv
Índice de Figuras	xvi
Símbolos e Abreviaturas	xvii

Capítulo I - Introdução

1.1. O xarope dos Frades Franciscanos	2
1.2. O <i>Aloé barbadensis</i> Miller	3
1.3. O mel	7
1.4. O aguardente	9
1.5. A actividade antioxidante e as espécies reactivas de oxigénio	9
1.5.1. Teste do DPPH	10
1.5.2. Teste do β -caroteno/ácido linoleico	10
1.5.3. Determinação de compostos fenólicos totais	12
1.5.4. Teste da actividade quelante do Fe(II)	12
1.5.5. Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II)	14

1.6. Teste da inibição do enzima α -glicosidase	14
1.7. Teste da inibição do enzima COX-1	15

Capítulo II – Materiais e Métodos

2.1. Material em estudo.....	17
2.2. Reagentes químicos e equipamentos	17
2.3. Preparação dos extractos	18
2.4. Avaliação da actividade antioxidante pelo teste do DPPH	19
2.5. Avaliação da actividade antioxidante pelo teste do β -caroteno/ácido linoleico ...	19
2.6. Determinação de compostos fenólicos totais (Teste de Folin-Ciocalteu)	20
2.7. Teste da actividade quelante do Fe(II)	20
2.8. Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II)	21
2.9. Teste da inibição do enzima α -glicosidase	21
2.10. Teste da inibição do enzima COX-1	22
2.11. Teste de viabilidade celular em células do carcinoma mamário humano da linhagem MCF7	23
2.12. Diagrama-resumo dos testes realizados	24
2.13. Análise do extracto de acetona do xarope de Aloé dos Frades por TLC preparativa	25
2.14. Espectroscopia de FTIR	25
2.15. Espectroscopia de RMN	26

Capítulo III – Resultados e Discussão

3.1. Ensaio prévio	28
3.2. Obtenção do extracto	29
3.3. Avaliação da actividade antioxidante pelo teste de DPPH	30
3.4. Avaliação da actividade antioxidante pelo teste do β -caroteno/ácido linoleico	31
3.5. Determinação de compostos fenólicos totais	32
3.6. Actividade quelante do Fe(II)	33
3.7. Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II)	34
3.8. Teste da inibição do enzima α -glicosidase	36
3.9. Teste da inibição do enzima COX-1	37
3.10. Teste de viabilidade celular em células do carcinoma mamário humano da linhagem MCF7	38
3.11. Análise do extracto de acetona do xarope de <i>Aloé</i> dos Frades por TLC preparativa	39
3.12. Espectroscopia de FTIR	39
3.13. Análise por RMN do composto CI-XAFC(2), isolado do extracto de XAFC por TLC preparativa	41
3.14. Teste da actividade quelante do Fe(II) aos compostos isolados por TLC preparativa	43
3.15. Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II) aos compostos isolados por TLC preparativa	43

Capítulo IV – Conclusão

4.1. Conclusões	46
4.2. Perspectivas futuras	47
Referências	49
Anexos	59

Índice de Anexos

Anexo 1

Gráfico 1 – Curva de calibração de ácido gálico para o teste de determinação de compostos fenólicos totais	60
--	----

Anexo 2

Gráfico 2 – Curva de calibração de ácido ascórbico para o teste de inibição da redução do Fe(III) a Fe(II)	61
--	----

Anexo 3

Gráfico 3 – Concentração de Trolox versus actividade antioxidante (%)	62
---	----

Anexo 4

Gráfico 5 – Determinação do IC ₅₀ da actividade quelante do extracto de XAFC	63
Gráfico 6 – Determinação do IC ₅₀ da actividade quelante do extracto de XALC	63
Gráfico 7 – Determinação do IC ₅₀ da actividade quelante do extracto de <i>A. vera</i>	64
Gráfico 8 – Determinação do IC ₅₀ da actividade quelante do extracto de XAFB	64
Gráfico 9 – Determinação do IC ₅₀ da actividade quelante do EDTA	65

Anexo 5

Gráfico 10 – Inibição da α -glicosidase versus concentrações de extracto seco de XAFC	66
--	----

Anexo 6

Gráfico 11 – Inibição da COX-1 versus concentrações de extracto seco de XAFC	67
Gráfico 12 – Inibição da COX-1 versus concentrações de indometacina	67

Anexo 7

Gráfico 13 – Viabilidade celular em células do carcinoma mamário humano da linha MCF7 versus concentrações do extracto de XAFC	68
--	----

Anexo 8

Espectro de FTIR do extracto de XAFC antes da TLC preparativa	69
---	----

Anexo 9

Espectro de FTIR do composto IC-XAFC(2) isolado por TLC preparativa	70
---	----

Anexo 10

Tabela resumo dos resultados dos testes realizados aos diferentes extractos secos	71
---	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Ensaio prévio para a avaliação do melhor solvente de extracção.....	28
Tabela 2 – Relação entre solvente e massa de extracto seco obtida.	29
Tabela 3 – Actividade antioxidante através do teste do DPPH relativamente aos diferentes extractos secos.....	30
Tabela 4 – Actividade antioxidante avaliada através do teste de β -caroteno/ácido linoleico dos extractos secos de n-butanol e acetona do xarope de Aloé do Frades.....	32
Tabela 5 – Compostos fenólicos totais obtidos, relativamente aos diferentes extractos secos.....	32
Tabela 6 – Teste da actividade quelante do Fe(II), relativamente aos diferentes extractos secos.....	33
Tabela 7 – Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II), relativamente aos diferentes extractos secos.....	35
Tabela 8 – Teste da inibição do enzima α -glicosidase relativamente ao extrato seco de XAFC.....	36

Tabela 9 – Teste da inibição do enzima COX-1 relativamente ao extrato seco de XAFC.	37
Tabela 10 – Teste da viabilidade celular em células do carcinoma mamário humano da linhagem MCF7 relativamente ao extrato seco de XAFC.....	38
Tabela 11 – Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II), relativamente aos dois compostos isolados por TLC preparativa.	43

Índice de Figuras

Fig. 1 - Interior da folha de <i>Aloé Vera</i>	3
Fig. 2 – Planta de <i>Aloé Vera</i>	4
Fig. 3 – Estruturas moleculares dos compostos: A – aloína; B – aloe-emodina; C – aloesina (Harlev et al., 2012).....	6
Fig. 4 – Estrutura molecular do ácido caféico.....	8
Fig. 5 – Estabilização do radical livre de DPPH.....	10
Fig. 6 - Estrutura molecular do β -caroteno (1) e do ácido linoleico (2).....	11
Fig. 7 – Estrutura molecular do BHT.....	11
Fig. 8 - Estrutura molecular do ácido gálico.....	12
Fig. 9 – Estrutura molecular do ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox)	30
Fig. 10 – Estruturas moleculares dos compostos: A – aloína; B – aloe-emodina; C – aloesina.....	40
Fig. 11 – Espectro de próton, ^1H , do composto CI-XAFC (2) obtido por TLC preparativa.....	41
Fig. 12 – Espectro de próton, ^{13}C , do composto CI-XAFC (2) obtido por TLC preparativa.....	42

Símbolos e Abreviaturas

A - Absorvância

AA (%) – Actividade antioxidante em percentagem

Aamostra – Absorvância da amostra

A_{CN} – Absorvância do controlo negativo

A_{CP} – Absorvância do controlo positivo

AINEs – Anti-inflamatórios não esteróides

Ao – Absorvância do branco ou controlo

BHA – uma mistura de 2 isómeros, o 2 e o 3-terc-butil-4-hidroxianisol

BHT – 2,6-di-terc-butil-4 hidroxitolueno

CI-XAFC – Composto isolado do extracto de acetona do xarope de *Aloé* dos Frades

DPPH – 2,2'- difenil-1-picril-hidrazil

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Meio de Eagle modificado por Dulbecco

EAG – Equivalentes de ácido gálico

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

EC50 – Concentração da amostra que promove 50% de extinção do radical

FTIR – *Fourier Transmission Infrared*

I - Inibição

IC₅₀ – Concentração da amostra que promove 50% de inibição do oxidante

ip – *in plane vibration*, no plano de vibração

m – massa

M – mol/dm³

MCF7 – *Michigan Cancer Foundation-7*

MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

oop – *out of plane vibration*, fora do plano de vibração

PNPG – p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo

ppm – partes por milhão

ROS – *Reactive oxygen species*, espécies reactivas de oxigénio

TLC – *Thin Layer Chromatography*, cromatografia de camada fina

TMPD – N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina

TMS – Tetrametilsilano

Trolox – ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano

USP – *United States Pharmacopoeia*

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

V1 – velocidade inicial da reacção do enzima com o inibidor

V2 – velocidade inicial da reacção do enzima

XAFC – Extracto de acetona do xarope de *Aloé* dos Frades

XAFB – Extracto de *n*-butanol do xarope de *Aloé* dos Frades

XALC – Extracto de acetona do xarope de *Aloé* preparado no laboratório

Capítulo I

Introdução

1.1. O xarope dos Frades Franciscanos

Na medicina tradicional acredita-se que um xarope feito com uma velha receita de Frades Franciscanos provoca melhoras em patologias inflamatórias e tumorais. Este xarope é um remédio caseiro muito usado em Portugal e no Brasil. De facto, esta receita foi trazida por Frei Romano Zago, nascido no Brasil em 1932, que a espalhou por vários países, incluindo Portugal.

O xarope é constituído por folhas de *Aloe barbadensis* Miller, 34,0%, mel, 65,8% e aguardente, 0,2%, segundo a informação prestada pelos Frades. Sabe-se que tanto a planta de *Aloé vera*, como o mel e o aguardente têm actividade antioxidante (Bertonceli et al., 2007; Canas et al., 2008). Actividade anti-inflamatória e anti-tumoral é encontrada no mel e na planta (Harlev et al., 2012; Jaganathan, 2011).

Verificou-se também, num trabalho realizado em 2010, com ratinhos, que o mel coadjuvado pelo *A. vera* tem efeito antitumoral, mais especificamente reduz a proliferação das células malignas e aumenta a possibilidade de apoptose (Tomasin, Gomes-Marcondes, 2011).

Relativamente ao xarope, este pode adquirir-se em seminários e conventos de frades Franciscanos e é elaborado de forma artesanal. Quando este é adquirido é facultado um folheto com informações sobre o produto, em que se refere que a função do mesmo é tratar neoplasias, reduzir o envelhecimento das células e favorecer a circulação no cérebro. São referidas ainda curas de cancro, doenças de pele, reumatismo, artrite e úlceras.

A título preventivo é aconselhado a toma de duas garrafas de 750 mL, devendo ser ingeridas duas colheres de sopa, trinta a quinze minutos antes das três principais refeições. No caso de cancro, é aconselhada a toma de três colheres de sopa, trinta a quinze minutos antes das três principais refeições.

Mais tarde entrevistou-se o Frei Francisco do Seminário da Luz, que referiu ser eficaz no tratamento de tumores, na prevenção de gripes e constipações, e também na cura de queimaduras e outros problemas de pele.

Perguntou-se onde era colhida a planta e qual o mel e aguardente utilizada. O Frei referiu que a planta é colhida ao longo do país e que o mel é de rosmaninho ou eucalipto. Relativamente ao aguardente referiu que é de origem portuguesa.

Deste modo, para a elaboração desta receita no laboratório, escolheu-se um mel de rosmaninho português, um aguardente alentejana e colheu-se a planta em Torres Vedras, após o pôr do sol. Esta planta veio de uma plantação de *Aloé vera* no Algarve, posteriormente foi transplantada e ambientada ao clima de Torres Vedras.

No final da entrevista ao Frei e após os seus relatos ficou a dúvida se se tratava de efeito placebo ou efeito bioquímico, pelo que pensou-se ter interesse estudar o xarope para se perceber se as curas que os pacientes referiram tinham fundamento científico.

1.2. O *Aloé barbadensis* Miller

O *Aloé barbadensis* Miller pertence ao reino *Plantae*, subreino *Tracheobionta* (plantas vasculares), superdivisão *Spermatophyta* (plantas que produzem sementes), divisão *Magnoliophyta* (plantas que produzem flor), Classe *Liliopsida* (monocotiledóneas), subclasse *Liliidae*, ordem *Liliales*, família *Aloaceae*, género *Aloe* L., espécie *Aloé vera* (<http://plants.usda.gov>).

Trata-se de uma planta parecida com um cacto, caracterizada por folhas lanceoladas com bordas irregulares e de pontas afiadas (Chang et al., 2011). A parte exterior consiste num tecido espesso, o interior é mucilaginoso, de cheiro agradável mas com sabor amargo.



Fig. 1 - Interior da folha de *Aloé Vera* (<http://guiadanutricao.com>)

Esta planta tem a capacidade de armazenar grandes quantidades de água nos seus tecidos e é capaz de realizar o metabolismo ácido das crassuláceas, ou seja, de absorver dióxido de carbono à noite, armazenando-o sob a forma de ácido málico e este por sua vez, por acção da luz solar, é transformado em glicose. O que significa que estamos perante uma planta capaz de sobreviver em meios áridos (Takahashi et al., 2005; Ni et al., 2004).

O nome científico *Aloé vera* foi atribuído por Carl Von Linne, em 1720, mas existem registos de utilização desta planta pelos povos do Mediterrâneo desde o ano de 400 a.C. com origem em África. *Aloé vera*, posteriormente denominada *Aloé barbadensis* Miller, há muito tempo que tem sido estudada, havendo inúmeras publicações científicas que descrevem a sua bioactividade e respectivos compostos (Araújo et al., 2002).



Fig. 2 - Planta de *Aloé Vera* (fotografia pessoal)

Existem mais de 360 espécies de *Aloé* espalhadas pelo mundo, no entanto o *Aloé barbadensis* Miller (*A. vera*) é o mais usado comercialmente para cosmética, como hidratantes, cremes de rosto, mãos, desmaquilhantes, sabonetes, géis de banho, loções protectoras, champôs, amaciadores, tónicos capilares, loções de barbear, preparação de fragrâncias, loções e toalhetes para bebé. Também é utilizado na alimentação e para fins terapêuticos (Hu et al., 2003; Lee et al., 2000). O primeiro registo de utilização terapêutica remonta a 1697, no continente americano, no entanto só em 1820 é que foram reconhecidos os efeitos purgativos e cicatrizantes pela farmacopéia dos Estados Unidos da América – USP (Araújo et al., 2002).

A parte da folha com maior relevância para a indústria alimentar e cosmética tem sido o gel de *A. vera*, sendo muitas vezes descartada a parte rija da folha (Beppu et al., 1993). O gel de *A. vera* provém das células do parênquima das folhas e contém polissacáridos de ligações (1,4) polidispersas e com mananas acetiladas (Singh et al, 2012). Alguns compostos da parte rija da folha são polissacáridos, álcoois, lignina, hemicelulose, substâncias celulósicas e pectinas (Femenia et al., 1999). Também foi referido que as flores de *A. vera* são ricas em ácido ascórbico (Yin et al., 2003) e componentes voláteis (Hou et al., 2003).

No entanto, não foram apenas estes os compostos identificados no *A. vera*, na polpa da folha também existem:

- Antraquinonas: aloe-emodina, ácido aloético, antranol, barbalóina, isobarbalóina, emodina e éster do ácido cinâmico;
 - Hidratos de carbono: manana, manana acetilada, glucomanana acetilada, glucogalactomanana, galactana, galactogalacturana, arabinogalactana, galactoglucoarabinomanana, substâncias pépticas, xilana e celulose;
 - Cromonas: 8-*C*-glucosil-(2'-*O*-cinamoil)-7-*O*-metilaloediol A, 8-*C*-glucosil-(*S*)-aloesol, 8-*C*-glucosil-7-*O*-metil-(*S*)-aloesol, 8-*C*-glucosil-7-*O*-metilaloediol, 8-*C*-glucosil-noreugenina, isoaloesina D, isorabaicromona e neoaloesina A;
 - Enzimas: fosfatase alcalina, amilase, carboxipeptidase, catalase, ciclooxidase, ciclooxigenase, lipase, oxidase, fosfoenolpiruvato carboxilase e superóxido dismutase;
 - Compostos Inorgânicos: ferro, magnésio, manganésio, potássio, fósforo, sódio e zinco;
 - Mistura de compostos orgânicos e lípidos: ácido araquidónico, ácido γ -linolénico, esteróides (campesterol, colesterol, β -sitosterol), triglicéridos, triterpeno, giberelina, lignina, sorbato de potássio, ácido salicílico e ácido úrico;
 - Aminoácidos não-essenciais e essenciais: alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina, valina;
 - Proteínas: lectinas e substâncias *lectina-like*;
 - Sacarídeos: manose, glucose, *L*-ramnose e aldopentose;
 - Vitaminas: B1, B2, B6, C, β -caroteno, colina, ácido fólico e α -tocoferol.
- (Ni, Tizard, 2004; Dagne et al., 2000; Choi, Chung, 2003)

Muitos destes compostos são responsáveis pela bioactividade da planta, como a diminuição dos níveis de glucose no sangue, a redução dos níveis de lípidos em pacientes com hiperlipidemia (Vogler, Ernst, 1999), o efeito positivo sobre a cura de feridas, o alívio de queimaduras, o alívio de problemas intestinais, a redução do inchaço devido a artrites, o efeito curativo em úlceras, a estimulação da resposta imunitária contra o cancro (Beppu et al., 1993; Harlev et al., 2012). Tem ainda sido discutido o seu efeito sobre o VIH, tendo um estudo recente verificando que o *Aloé* permite melhorias a nível de perdas de peso para quem é portador do síndrome (Olatunya et al., 2012). Ressalvando-se que o *A. vera* tem efeito citotóxico sobre as células tumorais e não sobre as células normais (Pecere et al., 2000).

O extrato de *A. vera* possui uma elevada capacidade de capturar radicais (Zhang et al., 2001). Verificou-se que alguns dos compostos responsáveis por esta propriedade antioxidante são polifenóis como as antraquinonas e as cromonas (Zonta et al, 1995). Particularizando relativamente às antraquinonas, verificou-se que um derivado da aloesina demonstrou ter efeito antioxidante e a aloe-emodina demonstrou efeitos protectores, impedindo a peroxidação lipídica, bem como protecção da inflamação causada pelo processo da peroxidação (Arosio, et al., 2000). Num outro estudo, *in vitro*, verificou-se que a aloína, aloe-emodina e a acemanana, que é um polissacarídeo, têm efeito anti-proliferativo, sendo também citotóxicas para algumas linhas tumorais, como as linhas celulares leucémicas, K562, no caso da aloína e linhas celulares do carcinoma do cólon, DLD-1, HT2 e WiDr, no caso da aloe-emodina (Harlev et al., 2012).

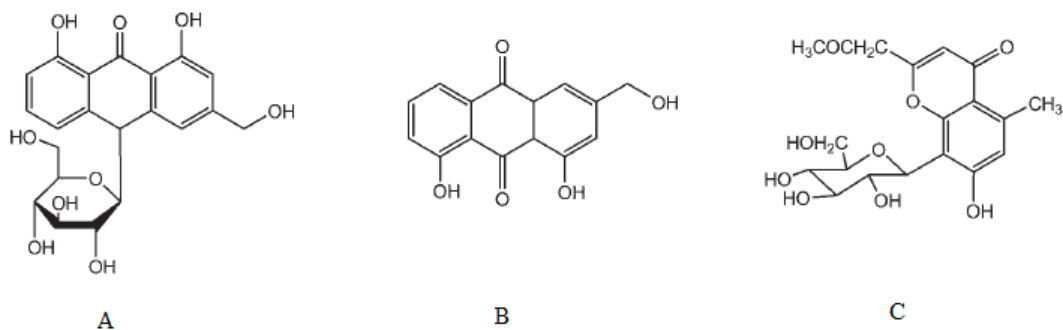


Fig. 3 – Estruturas moleculares dos compostos: A – aloína; B – aloe-emodina; C – aloesina (Harlev et al., 2012).

No entanto, o consumo de *Aloé* puro é tóxico e nocivo para a saúde humana. Constatou-se que o consumo da polpa de *A. vera* está associado a diarreia e desequilíbrio electrolítico, podendo provocar hipocalémia (Cooke, 1981). A polpa gelatinosa da planta, seca, contém, 40% do diastereoisómero antrona-C-glicosídica (Beil, Rauwald, 1992), que é um laxante registado nas farmacopeias (Beil, Rauwald, 1993). Devido às propriedades laxativas está associado à melanose *coli* que por sua vez é responsável pelo desenvolvimento do cancro colo-rectal (Siegens, et al., 1993). Outros efeitos adversos do *A. vera* é a perda de peso, distúrbios do sistema nervoso central, disfunção renal, chegando mesmo a ser considerado genotóxico e talvez mutagénico (Mueller et al., 1996) Acrescentando ainda que a polpa de *A. vera* é suspeita de interagir com alguns fármacos, em particular os corticosteróides e os digitálicos (Mascolo et al., 2004; Abebe, 2003).

1.3. O mel

O mel é o resultado da reacção entre os enzimas libertadas pelas abelhas e o néctar recolhido das flores, fazendo parte, desde há milhares de anos, dos hábitos alimentares da humanidade e de alguns animais.

O mel é constituído essencialmente por frutose, glucose, acrescido de proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas e minerais (Pérez, 2002; Terrab et al., 2003), onde os compostos minoritários, com actividade antioxidante, são os flavonóides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico, catalase, peroxidase, carotenóides e produtos da reacção de Maillard (Canas et al., 2008). Estes antioxidantes são eficazes na redução do risco de doenças cardíacas, do declínio do sistema imunitário, cancro, cataratas e processos inflamatórios (Jaganathan, 2011). Ressalva-se que compostos bioactivos presentes no mel, como o ácido caféico, o fenil éster do ácido caféico e agliconas flavonóides, provaram ter um efeito inibitório de proliferação de células tumorais (Chinthalapally, et al., 1993).

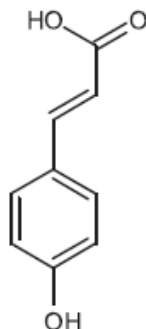


Fig. 4 – Estrutura molecular do ácido caféico (Biesaga e Pyrzyńska, 2003)

O mel tem também propriedades antibacterianas (Escuredo et al., 2012; Jeddar et al., 1985), antifúngicas e citostáticas (Swellam et al., 2003). No entanto, estas propriedades, bem como a actividade antioxidante e anti-inflamatória dependem da espécie da flor, da zona geográfica, da estação do ano, das condições ambientais e do tempo de armazenamento do mel (Swellam et al., 2003; Gheldof, Engeseth, 2002). Salienta-se ainda que, durante o processo de embalamento e armazenamento, o mel é habitualmente pasteurizado para dissolver os cristais de açúcar e destruir as leveduras. No entanto, este deve ser aquecido a uma temperatura moderada, entre os 45 °C e 50 °C, para que os compostos voláteis do mel não se percam e por sua vez, não se perca parte da sua bioactividade (Escriche et al., 2009).

As características do mel, sabor, aroma e cor, também são importantes para a sua comercialização, que podem ser mais ou menos intensos consoante a quantidade de flavonóides existentes. Os flavonóides existentes no mel dividem-se em três classes de estrutura semelhantes, flavonóis, flavonas e flavanonas (Al-Mamary et al., 2002; Yao et al., 2003).

1.4. O aguardente

O aguardente é uma bebida destilada a partir do mosto fermentado do vinho e amadurecido em barris de madeira antes de ser permitida a venda e respectivo consumo, consoante exige a regulamentação europeia n.º 110/2008 (Caldeira et al., 2010).

Ou seja, a produção do aguardente consiste na preparação da matéria-prima, fermentação, destilação e envelhecimento. Esta última etapa, o envelhecimento, é importante na medida em que vai permitir que se formem compostos que influenciam a cor, o odor e o sabor do destilado (Schmidt et al., 2009).

O aguardente tem actividade antioxidante, contendo na sua composição polifenóis, concretamente, taninos hidrolisáveis e ácidos fenólicos, nomeadamente, ácido gálico e ácido elágico. Esta actividade antioxidante aumenta com a idade de envelhecimento do aguardente (Canas et al., 2008).

1.5. A actividade antioxidante e as espécies reactivas de oxigénio

Testes antioxidantes efectuados com os extractos de xarope e com os extractos dos seus componentes servem para verificar se existe bioactividade capaz de captar espécies reactivas de oxigénio (ROS). As espécies reactivas de oxigénio, como por exemplo, o oxigénio singuleto (1O_2), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o anião de superóxido (O_2^-) e o radical hidroxilo ($\bullet OH$) são compostos responsáveis pela actividade oxidante e são gerados como subprodutos de reacções biológicas ou através de factores externos (Gyamfi et al., 1999). Em casos em que esteja envolvido o processo de *stress* oxidativo há um excesso de produção de ROS, o que acarreta a degradação dos componentes celulares, como o DNA, proteínas, lípidos e hidratos de carbono. Esta situação, normalmente provoca disfunções celulares que poderão terminar em morte celular (Dastmalchi et al., 2008). As ROS acarretam também, patologias como a artrite reumatóide, aterosclerose, envelhecimento da pele, nefrites, reperfusão, asma, diabetes *mellitus* e até carcinogénese (Gyamfi et al., 1999). Os testes antioxidantes realizados neste trabalho foram o teste do DPPH (2,2'-

difenil-1-picril-hidrazil), o teste de β -caroteno/ácido linoleico, a determinação de compostos fenólicos totais, o teste da actividade quelante do Fe(II) e o teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II).

1.5.1. Teste do DPPH

O teste do DPPH é muito utilizado para efectuar uma primeira triagem à actividade antioxidante apresentada pelas amostras em estudo.

O método do DPPH consiste na captura do radical DPPH através de antioxidantes presentes em solução, originando uma diminuição da absorvância a 517 nm, ou seja, a coloração violeta escura da solução metanólica de DPPH em presença de antioxidantes desaparece e a solução torna-se amarela.

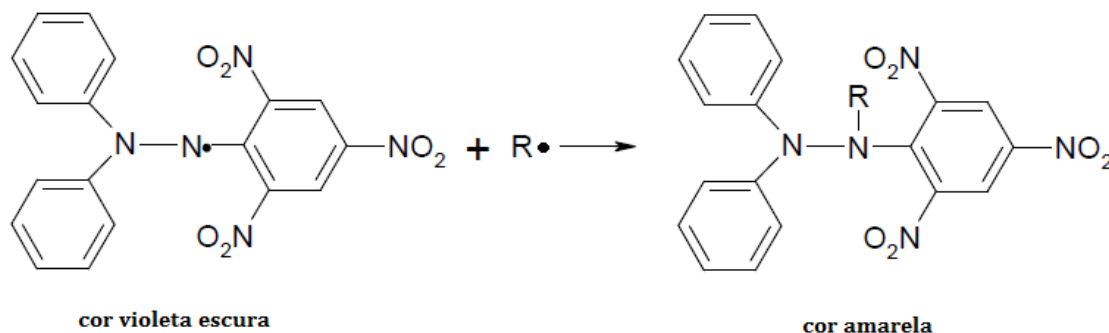


Fig. 5 – Estabilização do radical livre de DPPH (Rufino et al., 2007).

1.5.2. Teste de β -caroteno/ácido linoleico

O teste do β -caroteno/ácido linoleico simula a peroxidação lipídica das membranas celulares e a capacidade de determinada substância ou extracto, em análise, não o permitir, protegendo a oxidação do β -caroteno. Este mesmo extracto será responsável pela

captação de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Dastmalchi et al., 2008; Alves et al. 2010).

Durante o teste, o ácido linoleico sofre a oxidação induzida termicamente, a 50 °C, em que os radicais livres produzidos atacam o cromóforo do β -caroteno, resultando num descorar da solução. Um extracto que iniba o branqueamento do β -caroteno é um captador de radicais livres, ou seja, um antioxidante primário (Dastmalchi et al., 2008).

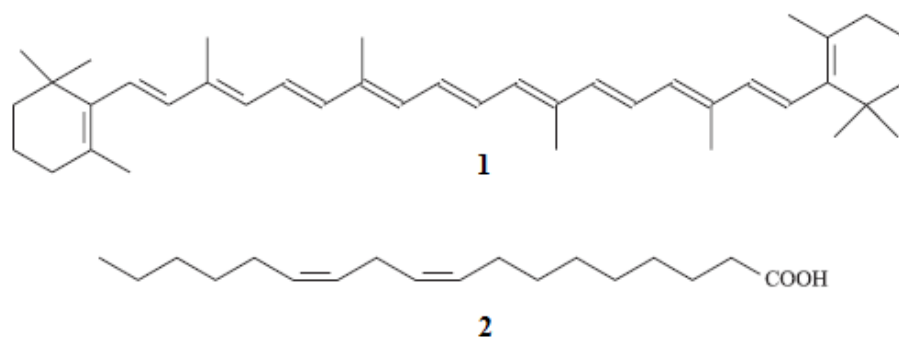


Fig. 6 - Estrutura molecular do β -caroteno (1) e do ácido linoleico (2) (Alves et al. 2010).

No método utilizado usa-se um emulsionante, o Tween-40, que permitirá a emulsão completa da mistura β -caroteno/ácido linoleico em água previamente saturada com oxigénio atmosférico. Como controlo positivo deverão ser utilizados padrões sintéticos, como BHA (uma mistura de 2 isómeros, o 2 e o 3-terc-butil-4-hidroxianisol), o BHT (2,6-di-terc-butil-4 hidroxitolueno), o Trolox, ou padrões naturais, como o ácido gálico ou a quercetina (Alves et al. 2010). O escolhido no nosso estudo foi o BHT.

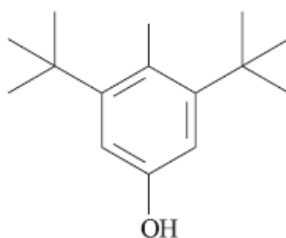


Fig. 7 – Estrutura molecular do BHT (Alves et al. 2010).

1.5.3. Determinação de compostos fenólicos totais

O teste para a Determinação de Compostos Fenólicos Totais consiste em fazer reagir o reagente de Folin-Ciocalteu, constituído por fosfomolibdato e fosfotungstato, com a amostra em estudo. A mudança de coloração de verde clara inicial para uma coloração verde escuro indica que estão presentes fenóis na amostra, sendo esta mudança de cor detectada ao comprimento de onda de 760 nm (Singleton et al., 1999).

Posteriormente comparou-se a absorvância das amostras com a curva de calibração de ácido gálico (Anexo 1), sendo os valores apresentados em Equivalentes de Ácido Gálico (EAG).

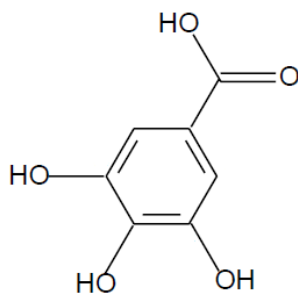


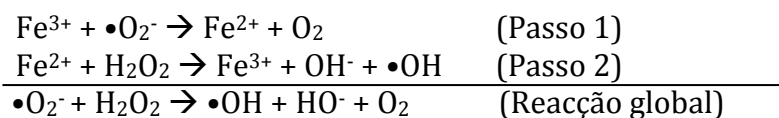
Fig. 8 - Estrutura molecular do ácido gálico (Souza Filho et al., 2008).

1.5.4. Teste da actividade quelante do Fe(II)

A acumulação de quantidades tóxicas de ferro no nosso organismo provoca danos nos tecidos e conduz a complicações tais como insuficiência cardíaca, distúrbios endócrinos como a diabetes, hipotiróidismo, insuficiência hepática e morte precoce. O excesso de ferro potencia ainda o aparecimento de ROS, que poderá provocar danos aos principais órgãos, especialmente ao sistema cardiovascular. O Fe(II) possui a capacidade de remover electrões, sendo por esta razão responsável pela formação e propagação de reacções radiculares (Ebrahimzadeh, et al, 2008). Tem-se também verificado que os iões de metais

de transição, como o Fe(II), podem contribuir para os danos oxidativos nas doenças neurodegenerativas, como as de Alzheimer e de Parkinson (Dastmalchi et al., 2008).

Uma das estratégias para evitar a formação de ROS e criar mecanismos de acção antioxidante é a quelação do metal de transição, impedindo assim a catálise da decomposição de hidroperóxidos e igualmente as reacções de Fenton (Dastmalchi et al., 2008; Ebrahimzadeh, et al, 2008; Uttara et al., 2009).



Esquema 1 – Reacções parciais e global de Fenton.

Determinadas substâncias ao quelarem o ferro, neutralizam directamente os radicais livres, o que fará com que este se torne cataliticamente inactivo. Muitas vezes estas substâncias com propriedades antioxidante e/ou quelantes são aproveitadas como aditivos alimentares para prevenir a descoloração, melhorar a qualidade nutricional e prolongar a validade dos produtos (Filgueiras, et al. 2009).

Uma das vantagens dos quelantes de ferro, é a de que ao captarem o ferro em excesso nos tecidos, formam complexos solúveis, estáveis e bioindisponíveis, que são posteriormente excretados nas fezes e/ou urina (Ebrahimzadeh, et al, 2008; Filgueiras, et al. 2009).

Sabe-se que um dos grupos de compostos presentes em amostras vegetais, como a que se encontra em estudo e com bastante actividade quelante, são os polifenóis (Lima et al., 2010).

No teste realizado na determinação da actividade quelante, foi utilizada a ferrozina, um reagente cromóforo, que forma uma solução rosa com o ferro. Assim, quanto menor a actividade quelante de iões da amostra, maior é o número de iões de ferro(II) disponíveis para reagir com a ferrozina, logo a absorvância da solução ensaio será maior (Lima et al., 2010).

1.5.5. Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II)

O estudo da inibição da redução do ferro (III) a ferro (II), sugere que o extracto de xarope tem a capacidade de doar electrões, podendo assim eliminar os radicais livres, sendo este passo importante para diminuir as patologias associadas ao stress oxidativo, como já referido anteriormente, no ponto 1.5.

1.6. Teste da inibição do enzima α -glicosidase

Sabe-se que os inibidores do enzima α -glicosidase são produtos usados como terapêuticos na diabetes (Asano, 2009). A diabetes mellitus tipo 1 é o resultado de uma desordem metabólica que tem efeitos na secreção de insulina e na actuação da mesma. A diabetes mellitus tipo 2 é caracterizada por um nível elevado de glucose no sangue, onde existe resistência à actuação da insulina e/ou insuficiência do organismo em produzir esta proteína (Andrade-Cetto et al., 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2006, a prevalência da doença crescerá de 171 milhões de pessoas em 2000 para 366 milhões de pessoas afectadas em 2030, prevendo-se que 9% da mortalidade, no mundo, será causada pela diabetes (Andrade-Cetto et al., 2008).

Entre os medicamentos hipoglicémicos, encontram-se os inibidores de α -glicosidase que retardam a absorção dos hidratos de carbono ingeridos, reduzindo a glicémia pós-prandial e os picos de insulina. (Stuart et al., 2004). O enzima α -glicosidase está localizado no intestino delgado e é necessário para a digestão dos hidratos de carbono, transformando-os em monossacarídeos absorvíveis (Andrade-Cetto et al., 2008).

Vírus perigosos como a dengue, o VIH e a hepatite B são conhecidos por serem sensíveis à inibição de α -glicosidase (Lee et al., 2011). Sabe-se ainda que as glicosidases estão também envolvidas numa variedade de distúrbios metabólicos e patologias degenerativas, incluindo a carcinogénese (Lee et al., 2011).

1.7. Teste da inibição do enzima COX-1

A ciclooxygenase-1 (COX-1) também conhecida como prostaglandina H2 sintase 1, é um enzima responsável pela produção de prostaglandinas que são importantes para a manutenção da integridade da mucosa gástrica, para a regulação do fluxo sanguíneo renal, que tem a capacidade de mediar a função normal das plaquetas e ajudar nas funções homeostáticas do organismo (Crofford, 1997).

Os fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) inibem o enzima COX-1, sendo este um dos responsáveis por converter o ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxano A2. O tromboxano é um vasoconstritor que em excesso no organismo pode originar problemas cardiovasculares e acidentes vasculares cerebrais, por isso a importância de, por vezes, ser necessária a inibição do COX-1 (Fosslien, 2000; Maree et al., 2005). A referir ainda que, a inibição do COX-1, num estudo realizado em ratinhos (Daikoku et al., 2006), revelou ter efeito antiproliferativo das células cancerígenas dos ovários.

Capítulo II

Materiais e Métodos

2.1. Material em estudo

- *Aloé barbadensis* Miller cultivado no Algarve e comercializado pelos Viveiros MMS, de Manuel Marques E Silvestre, Lda, Torres Vedras, Portugal.
- Mel de Rosmaninho, Moura, Portugal, Abel de Deus Ferreira, Apicultor – unidade de produção primária N.º 37254.
- Aguardente Bagaceira, Adega Cooperativa Borba, Portugal, 40% Vol.
- Xarope de *Aloé barbadensis* Miller preparado e comercializado no Seminário da Luz.
- Células do carcinoma mamário humano da linhagem MCF7.

2.2. Reagentes químicos e equipamentos

Foram utilizados acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, ácido araquidónico, ácido ascórbico, ácido gálico, ácido linoleico, β -caroteno, ciclooxigenase-1, clorofórmio, DMEM, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilsulfóxido deuterado, 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), etanol absoluto, éter dietílico, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , ferrozina, α -glicosidase, hematina, hexacianoferrato de potássio, KH_2PO_4 (1M), K_2HPO_4 (1 M), metanol HPLC-grade, MTT, Na_2CO_3 , *n*-butanol, PNPG, tampão fosfato (0,1 M; pH 6,8), TMPD, TMS, tris-HCl, tween 40, reagente de Folin-Ciocalteu, solução etanólica de H_2SO_4 (80%) e vanilina.

A TLC preparativa foi realizada num placa de silica gel 60 F₂₅₄ Merck, Ref.: 1.05715.0001, de 20x20 cm e a TLC analítica foi realizada numa placa de silica gel 60 F₂₅₄ Merck, Ref.: 1.05554.0001, de 2x6 cm. O eluente utilizado foi uma mistura de acetato de etilo/metanol/acetonitrilo, 7:2:1.

Nos ensaios das actividades antioxidantes, quantificação de fenóis e registo de cinética das reacções foi utilizado o espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. Para a investigação das composições químicas dos extractos for utilizado o espectrómetro de infravermelho Nicolet 6700 Spectrometer (Thermo Italy) equipado com a Smart Multi-Bounce Horizontal Attenuated Total Reflectance (HATR) com um cristal de selénio de zinco (ZnSe). Os

espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos através do espectrómetro Bruker Avance 400. Na realização dos testes em células de carcinoma mamário humano da linhagem MCF7 utilizou-se a câmara de fluxo laminar Esco Class II (Biohazard Safety Cabinet), a estufa Shel Lab Co e o microscópio óptico Motic-AE21.

Durante todas as experiências utilizou-se as balanças Mettler Toledo-PR1203 e Mettler Toledo-AX205 e também o agitador magnético Agimatic-N (P-Select).

2.3. Preparações dos extractos

Os extractos foram obtidos por maceração de 50 g de xarope em 50 mL de solvente (metanol (99,9%) ou etanol (100%) ou *n*-butanol (99,5%) ou éter dietílico ou acetona) deixando-se em agitação por 48 horas, à temperatura ambiente. Ao fim das 48 horas foi filtrado e evaporado, a vácuo. Para o *A. vera*, mel e o xarope preparado em laboratório, segundo a receita fornecida pelos Frades Franciscanos, foi utilizado o mesmo procedimento de extracção utilizando-se apenas a acetona.

Procedeu-se ainda à extracção dos resíduos de *A. vera* do xarope dos Frades, ou seja os restos de planta que foram filtrados após o primeiro processo de maceração do xarope. Posteriormente foram macerados novamente em acetona por 48 horas, filtrados e o solvente evaporado, a vácuo, obtendo-se desta forma um extracto dos resíduos de planta da primeira maceração. Este processo teve o intuito de verificar se existiriam compostos bioactivos por extrair durante o primeiro processo de maceração.

O aguardente não foi passível de extracção.

Os extractos secos foram rediluídos em metanol, pois tentou-se a solubilização com outros solventes mas sem sucesso.

2.4. Avaliação da actividade antioxidante pelo teste do DPPH

50µL de extracto foram adicionados a 5mL de solução metanólica de DPPH a uma concentração de 0,04 mg/mL ($1,014 \times 10^{-7} \text{M}$). Depois agitou-se com vigor e deixou-se em repouso por 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro, para em seguida medir-se a absorvância a 517nm (Mata et al., 2007). A AA (actividade antioxidante), expressa em %, foi calculada através da seguinte expressão:

$$AA(\%) = [(A_0 - A_{\text{amostra}})/A_0] \times 100$$

Os testes foram realizados em triplicado para concentrações de extracto da amostra de 1,0 mg/mL.

2.5. Avaliação da actividade antioxidante pelo teste do β-caroteno/ácido linoleico

0,2 mg de β-caroteno foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio. Em seguida adicionou-se 25µL de ácido linoleico e 200 mg de Tween 40, e transferiu-se para um balão de fundo redondo. Uma vez o clorofórmio removido, sob azoto, foram adicionados 50 mL de água destilada saturada com oxigénio, e a mistura resultante foi agitada vigorosamente durante 30 minutos, até completa homogeneização. Em seguida, foram transferidas para tubos de ensaio, alíquotas de 2,5 mL desta emulsão, e adicionados 300 µL de extracto dissolvido em metanol. A mistura reaccional foi bem agitada e a absorvância ($A(t=0)$), a 470 nm, foi registada. As amostras foram em seguida colocadas num banho de água a 50 °C, por um período de 120 minutos. Juntamente foram colocados dois brancos, um contendo BHT (2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno) como controlo positivo e outro com o mesmo volume de metanol, $A_0(t=0)$, em vez dos extractos. Neste tubo, mais tarde, observou-se uma oxidação completa, em que a solução adquiriu uma cor amarela desmaiada, $A_0(t=120)$, ao passo que o tubo de ensaio com o BHT, a cor amarela forte foi mantida durante o período de incubação. A absorvância de cada amostra foi medida após o aquecimento de 120 minutos ($A(t=120)$), a 470 nm.

A atividade antioxidante (AA), foi calculada utilizando a seguinte expressão (Alves et al. 2010):

$$AA\% = \left[1 - \frac{A(t=0) - A(t=120)}{Ao(t=0) - Ao(t=120)} \right] \times 100$$

A(t=0) – Absorvância da amostra no tempo inicial; A(t=120) - Absorvância da amostra aos 120 minutos; Ao(t=0) - Absorvância do controlo no tempo inicial; Ao(t=120) - Absorvância do controlo aos 120 minutos.

2.6. Determinação de compostos fenólicos totais (Teste de Folin-Ciocalteu)

O método de Determinação de Compostos Fenólicos Totais, utilizado neste trabalho, foi baseado em Dastmalchi et al. (2008), sofrendo alguma pequenas alterações; a 2,25 mL de água destilada foram adicionados 50 µL de amostra/extracto e 50 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se e deixou-se em repouso por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se 150 µL de Na₂CO₃ (2%) e voltou-se novamente a agitar, deixando em repouso por 120 minutos, à temperatura ambiente. Após decorrido este tempo, leu-se a absorvância ao comprimento de onda de 760 nm. Os valores obtidos serão apresentados em Equivalentes de Ácido Gálico (EAG), calculados a partir de uma curva de calibração traçada a partir dos resultados obtidos com várias soluções de ácido gálico (Anexo1).

2.7. Teste da actividade quelante do Fe(II)

A 200 µL de amostra, adicionou-se 100 µL de FeCl₂.4H₂O (2,0 mmol /L) e 900 µL de metanol. Após 5 minutos de incubação, deu-se início à reacção através da adição de 400µL de ferrozina (5,0 mmol /L). Após mais 10 minutos de incubação, registou-se a absorvância a 562 nm. A atividade quelante, em percentagem, calculou-se através da seguinte equação:

$$I \% = \frac{A_o - A_{amostra}}{A_o} \times 100$$

Os valores da actividade quelante obtidos com várias concentrações, permite estabelecer o IC₅₀ para as diferentes amostras.

2.8. Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II).

Este teste foi realizado, segundo Dastmalchi et al., 2008, com algumas modificações: a 50 µL de amostra foram adicionados 4,25 mL de água destilada e em seguida adicionou-se 500µL de FeCl₃ (0,1M), misturou-se e aguardou-se 3 minutos. Ao fim deste tempo, adicionou-se 500µL de hexacianoferrato de potássio (0,08M), agitou-se e aguardou-se 15 minutos para logo de seguida efectuar-se a leitura da absorvância a 720 nm. Para finalizar mediu-se a absorvância a um comprimento de onda de 720 nm. Na fase seguinte, deverão comparar-se os valores registados com a curva de calibração obtida com ácido ascórbico (Anexo 2). Os valores obtidos serão apresentados em Equivalentes de Ácido Ascórbico (EAA).

2.9. Teste da inibição do enzima α-glicosidase

Incuba-se a 37 °C, por 5 minutos, 60 µL da amostra; em seguida adiciona-se 270 µL da solução do enzima (10 U/mL) e repete-se a incubação a 37 °C por mais 5 minutos. Adiciona-se 150 µL do reagente de cor (PNPG) e 450 µL da solução tampão, incubando por mais 30 minutos. Após este tempo, adiciona-se 930 µL da solução de Na₂CO₃ (1 M) para parar a reacção. Por conseguinte realiza-se a leitura da absorvância a 405 nm.

O controlo positivo ou branco contém todos os reagentes excepto o enzima, adicionando-se tampão no lugar do enzima. A absorvância do branco será descontada da absorvância da amostra;

O controlo negativo contém todos os reagentes, incluindo o enzima, mas em que o extracto é substituído por tampão. O valor deste controlo é utilizado no cálculo do valor de inibição do enzima (Andrade-Cetto et al., 2008).

$$I\% = \frac{A_{CP} - (A_{amostra} - A_{CN})}{A_{CP}} \times 100$$

A_{CP} – absorvância do controlo positivo; A_{CN} – absorvância do controlo negativo; $A_{amostra}$ – absorvância da amostra; $I\%$ - inibição em percentagem.

2.10. Teste da inibição do enzima COX-1

A 425 μL de tampão tris-HCl (pH 8, 100 mM e à temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$) foram dissolvidos 100 μL do enzima COX-1, correspondendo a 100 U/ μL . Em seguida, adicionou-se 50 μL de hematina, de modo que a concentração deste ensaio fosse de 3 μM . Aguardou-se 5 minutos para permitir a reconstituição do enzima. Depois, adicionou-se 25 μL de extracto e 25 μL de DMSO, também a 25 $^{\circ}\text{C}$, agitou-se ligeiramente e esperou-se 3 minutos. Após o tempo decorrido, foram adicionados 100 μL de TMPD. Para iniciar a reacção adicionou-se 25 μL de ácido araquidónico e de imediato analisou-se a variação cinética da absorvância nos 611nm, durante 60 segundos (Cullen et al., 1998). A concentração de TMPD e de ácido araquidónico no ensaio foi de 100 μM . A inibição foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$I (\%) = 100 \times \left(1 - \frac{V_1}{V_2}\right)$$

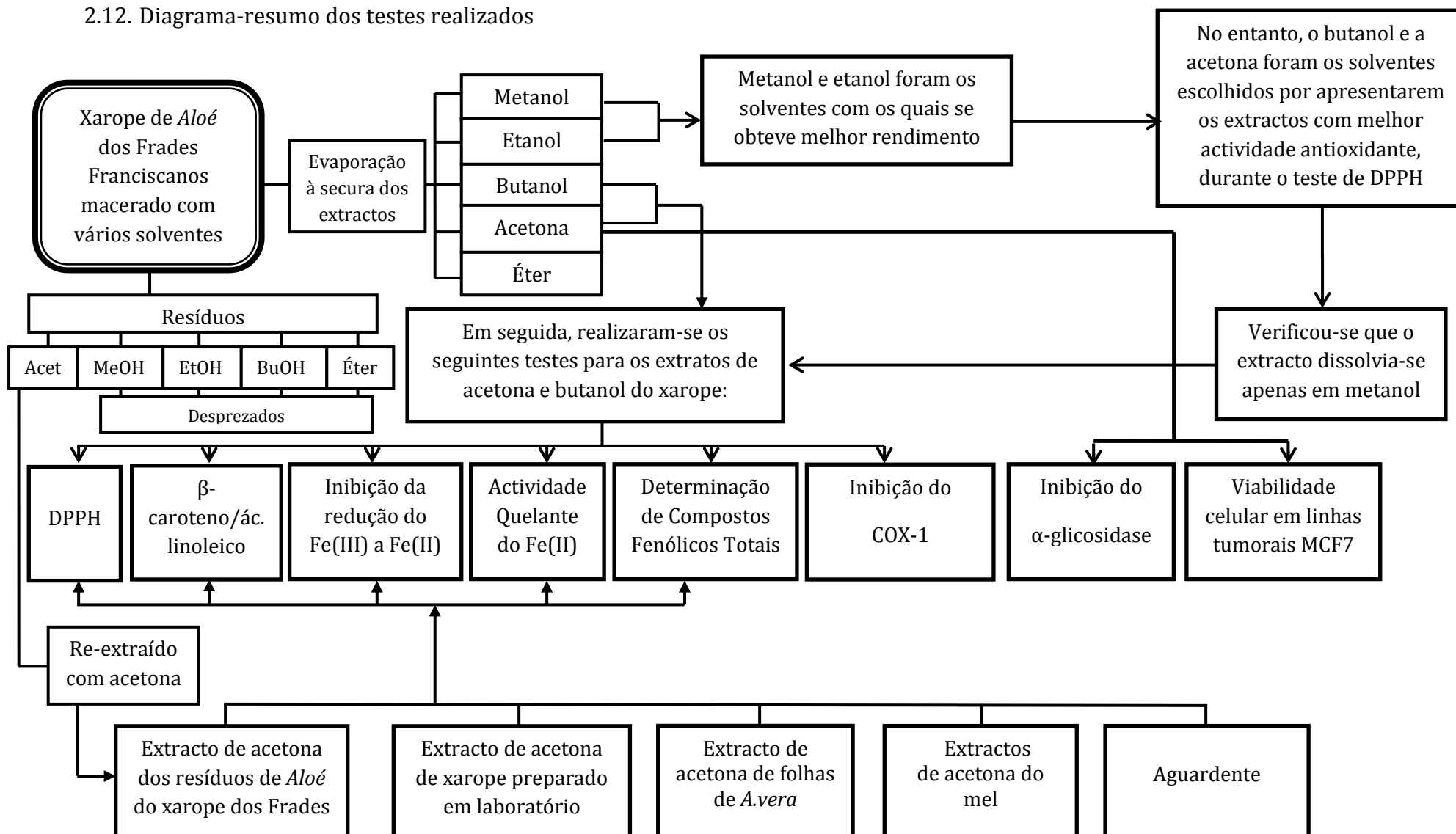
I – inibição; V_1 – velocidade inicial da reacção do enzima com o inibidor; V_2 – velocidade inicial da reacção do enzima.

2.11. Teste de viabilidade celular em células de carcinoma mamário humano da linhagem MCF7

O extracto seco do xarope de *Aloé* dos Frades de acetona foi dissolvido em DMSO, preparando várias concentrações de amostra para teste (10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL e 600µg/mL). Em seguida, adicionou-se 20 µL de amostra a 1980 µL de meio DMEM. Após 48 horas das células permanecerem em meio DMEM, para replicação, adicionou-se 100 µL da mistura, preparada anteriormente, às células de carcinoma mamário humano da linhagem MCF7 ($5,0 \times 10^3$ células por poço), ficando novamente em incubação, durante 48 horas. De seguida, foram adicionados 100 µL de MTT (0,5 mg/mL) e após duas horas em incubação, descartou-se o sobrenadante e procedeu-se à adição de 100 µL de DMSO para a dissolução dos cristais formados. A medição da absorvância foi realizada a 570 nm, para desta forma determinar o IC₅₀ (Holandino et al., 2001). Utilizou-se a seguinte equação para determinar a percentagem de viabilidade celular,

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100$$

2.12. Diagrama-resumo dos testes realizados



2.13. Análise do extracto de acetona do xarope de *Aloé* dos Frades por TLC preparativa

Preparou-se o solvente para a câmara de eluição, que consistiu em 105 mL de acetato de etilo, 30 mL de metanol e 15 mL de acetonitrilo. A amostra de extracto seco de XAFC (extracto de acetona do xarope de *Aloé* dos Frades), diluída em metanol, foi aplicada na placa de cromatografia sobre uma linha traçada a 2 cm do fundo da placa. De seguida a placa foi colocada dentro da câmara para eluição, deixando que o solvente migrasse até cerca de 1cm do topo da placa. Esta foi seca ao ar, parcialmente coberta com uma outra placa de vidro e pulverizada com um revelador que era constituído por uma solução de H_2SO_4 a 80% em etanol absoluto e umas gotas de vanilina. Para promover o aparecimento de manchas coradas, a zona revelada foi aquecida com um secador de ar quente. De seguida, a partir das manchas coradas que se formaram, estimou-se a sua continuação para a zona da placa que não foi revelada. Duas das zonas, ou bandas, maiores foram então raspadas e os compostos, nelas presentes, extraídos por três vezes com uma mistura de 5 mL de acetato de etilo e 3 gotas de metanol.

Os compostos isolados foram posteriormente analisados por TLC analítica no mesmo sistema de eluente para verificar a pureza dos mesmos.

2.14. Espectroscopia de FTIR

A preparação da amostra para a obtenção do espectro de FTIR consistiu em depositar uma gota de extracto de XAFC diluído em metanol, sobre o cristal de ZnSe. O líquido foi espalhado através de uma corrente de azoto que ao mesmo tempo favorece e evapora o solvente. O cristal de ZnSe foi montado num acessório do espectrómetro de FTIR, mais propriamente no Smart Multi-Bounce Horizontal Attenuated Total Reflectance (HATR). O espectro foi obtido entre 4000 e 500 cm^{-1} , com 128 acumulações e uma resolução de 4 cm^{-1} .

2.15. Espectroscopia de RMN

Cerca de 5mg de cada amostra, CI-XAFC(1) e CI-XAFC(2), foram dissolvidas em DMSO deuterado e posteriormente analisadas no espectrómetro Brucker Avance 400. O espectro de próton (^1H) foi obtido a 400MHz com 64 acumulações, usando o TMS como referência. O espectro de carbono (^{13}C) foi obtido a 100 MHz com 3072 acumulações, usando o TMS como referência.

Capítulo III

Resultados e Discussão

3.1. Ensaio prévios

Devido à popularidade do xarope de *A. vera* dos Frades Franciscanos com a descrição de remissão de tumores, pensou-se que seria interessante estudar este preparado com o objectivo de avaliar se a sua utilização tem algum fundamento científico ou é apenas efeito placebo.

Num ensaio prévio para averiguar qual o melhor solvente do extracto utilizou-se 50 g de xarope, o qual foi extraído com 50 mL de diversos solventes de polaridade crescente: éter etílico, acetona, metanol, etanol e *n*-butanol.

Avaliou-se a AA pelo teste do DPPH desta amostra. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Ensaio prévio para a avaliação do melhor solvente de extracção.

Solvente	m extrato (mg)	Rendimento - η (%)	E (%)
éter dietílico	25	0,05	1,94±1,66
acetona	1185	2,37	28,95±0,85
metanol	8367	16,73	16,28±0,59
etanol	6572	13,14	6,08±1,96
<i>n</i> -butanol	3873	7,75	16,96±0,59

Verifica-se que os extractos com maior rendimento são os macerados com metanol, etanol e *n*-butanol, ou seja, os que apresentam maior polaridade. No entanto, com estes resultados conclui-se que apesar da acetona ser um dos solventes que origina um extracto seco de menor massa, é o que apresenta maior actividade antioxidante no teste de DPPH. O extracto de *n*-butanol foi o segundo mais activo, pelo que os testes subsequentes foram efectuados com estes dois extractos, acetona e *n*-butanol.

3.2. Obtenção do extracto

De acordo com os resultados obtidos no ponto anterior procedeu-se à extracção de mel, de *A. vera* triturado, de resíduos do xarope dos Frades Franciscanos e de um xarope preparado em laboratório (segundo a receita tradicional), com acetona. O aguardente não foi passível de extracção.

A massa do extracto obtido e o respectivo rendimento são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Relação entre solvente e massa de extracto seco obtida.

	Amostra	m extrato (mg)	Rendimento - η (%)
Extratos de acetona	Xarope de <i>Aloé</i> dos Frades	1185	2,37
	Resíduos de <i>Aloé</i> do xarope dos Frades	787	1,84
	Xarope de <i>Aloé</i> em laboratório	2150	2,15
	<i>Aloé vera</i>	407	2,04
	Mel	386	0,41
Extrato de <i>n</i>-butanol	Xarope de <i>Aloé</i> dos Frades	3873	7,75
Sem extração	Aguardente	-	-

Posteriormente pesquisou-se a actividade antioxidante destes extractos. E para o extracto de acetona do xarope de *Aloé* dos Frades (XAFC) analisou-se o seu efeito sobre dois enzimas, COX-1 e α -glicosidase. Também foram realizados testes de viabilidade celular, através do mesmo extracto de XAFC, a células do carcinoma mamário humano da linhagem MCF7.

3.3. Avaliação da actividade antioxidante pelo teste de DPPH

O intuito de realização do teste de DPPH, com os diferentes componentes do xarope, era o de averiguar de onde proveio, maioritariamente, a actividade antioxidante do mesmo, e se existiu efeito de sinergia ou de diluição, entre os compostos do xarope. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3, sendo os resultados apresentados em percentagem de extinção do radical e em equivalentes de Trolox, um antioxidante sintético muito utilizado neste tipo de análise. Com o objectivo de se obter resultados que possam ser facilmente comparáveis com os da literatura. Previamente foi traçada uma curva de calibração da actividade antioxidante de Trolox (Anexo 3).

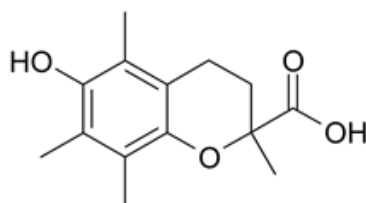


Fig. 9 – Estrutura molecular do ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox) (Santos et al., 2003; <http://structuresearch.merckchemicals.com>).

Tabela 3 – Actividade antioxidante através do teste do DPPH relativamente aos diferentes extracto secos

Amostra em estudo		DPPH (μg Trolox/mg extracto seco)
Extratos de acetona	Xarope de <i>Aloé</i> dos Frades	$0,5 \pm 0,1$
	Resíduos de <i>Aloé</i> do xarope dos Frades	$0,3 \pm 0,1$
	Xarope de <i>Aloé</i> em laboratório	$0,6 \pm 0,1$
	<i>Aloé vera</i>	$13,5 \pm 0,6$
	Mel	$4,2 \pm 0,3$
Extrato de <i>n</i> -butanol	Xarope de <i>Aloé</i> dos Frades	$1,0 \pm 0,2$
Sem extração	Aguardente	sem actividade

Relativamente aos resíduos de *Aloé* do xarope dos Frades, verificou-se efectivamente que existe ainda alguma actividade, tendo-se obtido $0,3 \pm 0,1$ μg Trolox/mg extracto seco, o que, comparado com o valor do xarope, $0,5 \pm 0,1$ μg Trolox/mg extracto seco, indica que a actividade antioxidante remanescente é ainda considerável.

Verificou-se que a planta de *A. vera* tem maior actividade antioxidante do que o xarope de *A. vera* preparado no laboratório, bem como o mel. Por isso pensou-se que se trata de um factor de diluição da actividade antioxidante. O aguardente não revelou actividade.

Comparando o extracto de acetona de ambos os xaropes, o dos Frades e o preparado em laboratório, verificou-se que a actividade antioxidante é sensivelmente a mesma. As diferenças podem dever-se ao tipo de mel utilizado e à planta, pois a actividade antioxidante do mel pode variar segundo o tipo de flor em que a abelha colheu o néctar e/ou o processamento do mel. No caso da planta, a actividade antioxidante depende da zona geográfica onde foi colhida, qual a época do ano, e muitos outros factores ambientais que podem influenciar o teor em compostos bioactivos de uma planta, dado que Frei Francisco durante a entrevista referiu que a planta era colhida antes do sol nascer ou após o pôr do sol, e poderia vir de qualquer ponto de país, como já referido na parte introdutória deste trabalho. O mel que os frades costumam adquirir é mel de rosmaninho ou mel de eucalipto. E uma vez que o mel de rosmaninho é rico em flavonóides, como o campeferol e a quercetina, e o segundo mel, rico em flavonóides, como a miricetina, tricetina e luteolina (Escuredo et al., 2012), podemos concluir que seja natural o desvio de valores da actividade antioxidante para os diferentes xaropes, dada a quantidade de variáveis existentes.

3.4. Avaliação da actividade antioxidante pelo teste do β -caroteno/ácido linoleico

Aplicou-se o teste do β -caroteno/ácido linoleico aos extractos de xarope de *Aloé* dos Frades em maceração de *n*-butanol e aos extractos dos Frades em maceração de acetona, com concentração no ensaio de 36 mg/mL, tendo obtido os seguintes resultados:

Tabela 4 – Actividade antioxidante avaliada através do teste de β -caroteno/ácido linoleico dos extractos secos de *n*-butanol e acetona do xarope de *Aloé* do Frades.

Extracto de xarope de <i>Aloé</i> dos Frades	AA%
Em acetona	72,63±4,16
Em <i>n</i> -butanol	51,92±5,49

Não nos foi possível traçar o IC₅₀ para os dois extractos de acetona e *n*-butanol porque os resultados obtidos vinham afectados de grande erro experimental devido à degradação do ácido linoleico utilizado.

3.5. Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada utilizando-se o reagente de Folin Ciocalteu e foi aplicado aos extractos de xarope de *Aloé* dos Frades, aos resíduos de *Aloé* do xarope, ao xarope preparado no laboratório, ao mel, ao *A. vera* e ao aguardente. O aguardente foi utilizada puro. Os resultados são expressos em μ g equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de extracto seco.

Tabela 5 – Compostos fenólicos totais obtidos, relativamente aos diferentes extractos secos.

Amostra em estudo		Determinação de Compostos Fenólicos Totais μ g EAG/mg extracto seco
Extratos de acetona	Xarope de <i>Aloé</i> dos Frades	1,61±0,18
	Resíduos de <i>Aloé</i> do xarope dos Frades	1,64±0,22
	Xarope de <i>Aloé</i> em laboratório	1,31±0,03
	<i>Aloé vera</i>	964,71±0,01
	Mel	5,73±0,29
Extrato de <i>n</i> -butanol	Xarope de <i>Aloé</i> dos Frades	1,01±0,45
Sem extração	Aguardente	80,87±0,87

Pode-se verificar que a planta sozinha apresenta elevada quantidade de fenóis quando comparada com o xarope. O mel e o aguardente também têm valores superiores de fenóis relativamente ao xarope. Entre o xarope dos Frades e o xarope preparado no laboratório, a diferença é de 0,3 µg EAG/mg extracto seco, estando próximo do desvio padrão do xarope dos Frades. Pode-se então concluir que a quantidade de compostos fenólicos totais é da mesma ordem de grandeza.

Os resíduos de *Aloé* do xarope dos Frades é que apresenta igual valor de compostos fenólicos quando comparado com o de origem.

Relativamente ao extracto de *n*-butanol, o valor obtido é semelhante ao do extracto de acetona.

3.6. Actividade quelante do Fe(II)

Para o teste da actividade quelante do Fe(II), para além da determinação do IC₅₀ para os extractos, também se determinou para o EDTA para posterior comparação. Os respectivos gráficos de determinação encontram-se no Anexo 4, e o resumo na Tabela 6:

Tabela 6 – Teste da actividade quelante do Fe(II), relativamente aos diferentes extractos secos

	Amostra em estudo	Teste da actividade quelante do Fe(II) IC ₅₀
Extratos de acetona	Xarope de <i>Aloé</i> dos Frades	20,15±1,90 mg/mL
	Resíduos de <i>Aloé</i> do xarope dos Frades	a)
	Xarope de <i>Aloé</i> em laboratório	1,73±0,62 mg/mL
	<i>Aloé vera</i>	0,24±0,10 mg/mL
	Mel	a)
Extrato de <i>n</i> -butanol	Xarope de <i>Aloé</i> dos Frades	3,68±0,89 mg/mL
Sem extração	Aguardente (40% V/V)	b)
	EDTA	0,009±0,002 mg/mL

- a) Sem actividade.
- b) Obteve-se o valor de 50% para uma amostra de aguardente puro (200µL, 171mg).

A primeira diferença significativa observada é a actividade quelante do extracto de XAFC e do extracto de XALC, onde este último demonstra actividade quelante a baixas concentrações em relação a XAFC. Para tal situação não se conseguiu obter justificação, a não ser a concentração dos compostos bioactivos na planta que pode variar segundo o tempo da colheita, as chuvas e outros factores ambientais que a planta possa vir a ter sofrido. No entanto, quando se compara o valor de extracção do XAFC e do XAFB, verifica-se que o extracto a partir deste último solvente tem maior poder quelante. Ou seja, o *n*-butanol é responsável por conseguir extrair em maior quantidade compostos com actividade quelante. Como o *A. vera*, mel e aguardente analisados, foram os mesmos componentes utilizados em laboratório para fazer o xarope, podemos comparar mais pormenorizadamente, onde o *A. vera* apresenta valor inferior ao do xarope de laboratório a que lhe corresponde, o que significa que com uma baixa concentração tem poder antioxidante e quelante superior. Quando em mistura, com o mel e o aguardente, apresenta valores inferiores, pensa-se que se trata de um factor de diluição, até porque o mel está em maior quantidade na composição do xarope (65,8%) e não apresenta actividade quelante. Verifica-se também que o XAFC tem uma actividade quelante razoável em relação ao EDTA, que é um composto puro.

3.7. Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II)

Para o teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II) realizou-se o cálculo em equivalentes de ácido ascórbico, tendo anteriormente sido traçada a curva de calibração (Anexo 2). Os valores obtidos para este teste estão em resumo na Tabela 7:

Tabela 7 – Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II), relativamente aos diferentes extractos secos

Amostra em estudo		Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II) mg EAA/mg extracto seco
Extratos de acetona	Xarope de <i>Aloé</i> dos Frades	0,233±0,009
	Resíduos de <i>Aloé</i> do xarope dos Frades	0,063±0,008
	Xarope de <i>Aloé</i> em laboratório	0,178±0,005
	<i>Aloé vera</i>	0,831±0,011
	Mel	0,564±0,013
Extrato de <i>n</i> -butanol	Xarope de <i>Aloé</i> dos Frades	0,133±0,005
Sem extração	Aguardente	a)

a) Sem actividade de inibição

Analisando os resultados do teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II) verifica-se que que o XAFC tem maior actividade inibitória do que o XALC. O extracto de acetona de *A. vera* tem um elevado valor de inibição da redução do Fe(III) a Fe(II), tendo-se obtido o valor de 0,831 mg de Equivalentes de Ácido Ascórbico por cada miligrama de extracto seco. Este resultado é muito significativo. O extracto de acetona do mel também apresenta um valor elevado de actividade inibitória por cada miligrama de extracto seco. O extracto de acetona dos resíduos de *Aloé* do xarope dos Frades é que apresenta um valor baixo de inibição, dado tratar-se de uma parte residual do xarope. O aguardente não apresentou actividade inibitória. Relativamente ao extracto de *n*-butanol verifica-se que este apresenta inferior inibição em relação ao de acetona, pelo que o solvente mais aconselhado para extracção de compostos com actividade de inibição de redução do Fe(III) a Fe(II) é a acetona.

3.8. Teste da inibição do enzima α -glicosidase

Realizou-se o teste do enzima α -glicosidase para o extracto de acetona do xarope de *Aloé* dos Frades, em que o gráfico se encontra no Anexo 5 e o resumo de valores na Tabela 8:

Tabela 8 – Teste da inibição do enzima α -glicosidase relativamente ao extrato seco de XAFC.

	Concentração do extracto seco do xarope de <i>Aloé</i> dos Frades (mg/mL)	Inibição do enzima α -glicosidase (%)
Extratos de acetona	0,010	33,27 \pm 1,20
	0,013	88,03 \pm 1,79
	0,016	91,03 \pm 1,25
	0,019	92,90 \pm 2,37
	0,023	97,73 \pm 1,06
	0,032	98,84 \pm 1,08

Realizou-se o teste da inibição da α -glicosidase para várias concentrações do extracto para encontrar o IC₅₀. No entanto, perto dos 90% estabilizou-se a curva, não sendo verosímil o valor por extrapolação, pois o erro associado é elevado. Acrescentando ainda que não foi possível testar as concentrações entre os 0,010 mg/mL e os 0,013 mg/mL por falta de disponibilidade do reagente PNPG. Desta forma considerou-se que o IC₅₀ para a capacidade de inibição da α -glicosidase encontra-se entre [0,010; 0,013] mg/mL.

Ressalva-se que se realizou um primeiro teste de inibição da α -glicosidase com o extracto butanólico do xarope de *Aloé* dos Frades mas como o valor era praticamente idêntico ao do extracto da acetona, resolvemos realizar apenas com este último extracto devido à baixa quantidade de PNPG que tínhamos disponível.

Encontra-se na literatura a descrição do efeito hipoglicemiante do exsudado da folha de *A. vera* (Grover et al., 2002). Os resultados obtidos com a inibição da α -glicosidase indica que esta actividade se mantém no xarope de *Aloé* dos Frades.

3.9. Teste da inibição do enzima COX-1

O teste de inibição do enzima COX-1 foi realizado para o extracto seco de XAFC, onde os valores encontram-se resumidos na Tabela 9 e o gráfico no Anexo 6. Acrescenta-se ainda que estes foram comparados com a inibição do COX-1 produzida pela indometacina, um anti-inflamatório não esteróide muito utilizado.

Tabela 9 – Teste da inibição do enzima COX-1 relativamente ao extrato seco de XAFC.

	Concentração (mg/mL)	Inibição do enzima COX-1 (%)	COX-1 IC ₅₀ (mg/mL)
Extracto de acetona do xarope de <i>Aloé</i> dos Frades Franciscanos	0,50	26,7±6,7	0,66±0,05
	0,80	71,1±3,8	
	1,00	98,0±3,5	
Indometacina	0,01	27,1±1,8	0,06±0,01
	0,02	32,8±1,8	
	0,05	40,6±5,4	
	0,06	50,0±3,1	

Verifica-se que o IC₅₀ para o extracto de XAFC, 0,66±0,05 mg/mL, é superior ao da indometacina, 0,06±0,01 mg/mL. O que significa que o xarope tem actividade anti-inflamatória inferior ao da indometacina. No entanto, não nos podemos esquecer que a

indometacina é um composto puro e o xarope é constituído por vários componentes, sendo neste momento desconhecido o componente do xarope responsável pela inibição do COX-1.

3.10. Teste de viabilidade celular em células do carcinoma mamário humano da linhagem MCF7

Foram realizados testes de viabilidade celular em células do carcinoma mamário humano da linhagem MCF7, aplicando o XAFC diluído em DMSO, onde os resultados encontram-se resumidos na Tabela 10 e o gráfico para a determinação do IC₅₀ no Anexo 7.

Tabela 10 – Teste da viabilidade celular em células do carcinoma mamário humano da linhagem MCF7 relativamente ao extrato seco de XAFC.

	Concentração (µg/mL)	Viabilidade celular (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
Extracto de acetona do xarope de <i>Aloé</i> dos Frades Franciscanos	50	62,22±9,99	413,87±80,34
	200	54,53±3,32	
	300	52,94±6,85	
	400	51,91±4,60	
	500	46,19±5,34	
	600	45,13±5,04	

Verifica-se que é necessário que a concentração do extracto seco de XAFC seja de 413,87±80,34 µg/mL, para que se observe uma diminuição da viabilidade celular das células do carcinoma mamário humano da linhagem MCF7, de 50%. O que significa que o xarope não tem elevada citotoxicidade mas tem actividade suficiente para eliminar as células do carcinoma em estudo.

3.11. Análise do extracto de acetona do xarope de *Aloé* dos Frades por TLC preparativa

Através da cromatografia de TLC preparativa obteve-se 4 mg de um composto de maior polaridade, CI-XAFC(1), e 15 mg de um composto de menor polaridade, CI-XAFC(2).

Os compostos CI-XAFC(1) e CI-XAFC(2) foram analisados por TLC analítica no mesmo sistema de eluente, tendo-se revelado puro o composto CI-XAFC(2), sendo este o escolhido para posterior análise por espectroscopia de FTIR e por estrectroscopia de RMN.

3.12. Espectroscopia de FTIR

O espectro de FTIR do extracto seco de XAFC (Anexo 8) apresenta bandas a:

- 3294 cm^{-1} e 3285 cm^{-1} , que correspondem à vibração de estiramento de grupos O-H, e a 1248 cm^{-1} , que corresponde à elongação de C-O(H), indicando a presença de grupos hidroxilo;
- 2920 cm^{-1} , que corresponde à vibração de estiramento C-H de um carbono sp^3 ; e a 1145 cm^{-1} , que corresponde a $\text{HC}(\text{CH}_3)_2$, indicando a presença de cadeias carbonadas;
- 1646 cm^{-1} , que corresponde à vibração de estiramento C=C, ou às ligações C=O de uma quinona; 1408 cm^{-1} , que corresponde a $\text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{O}$ (metil cetonas), acetais ou $\text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{C}$, indicando a presença de grupos cetona e alquenos;
- 2850 cm^{-1} , que corresponde à vibração de estiramento H-C(-O), $\text{H}_3\text{C}-\text{O}$ ou $\text{H}_2\text{C}-\text{O}$; 1050 cm^{-1} e 1031 cm^{-1} , que correspondem à vibração de estiramento de C-O, indicando a presença de grupos éter (Pretsche et al., 2009).

A informação anterior é insuficiente para identificar os componentes do extracto, mas é uma indicação de que este deve ser formado por uma ou mais estruturas semelhantes às apresentadas na Fig. 8 e que foram identificadas no *A. vera*.

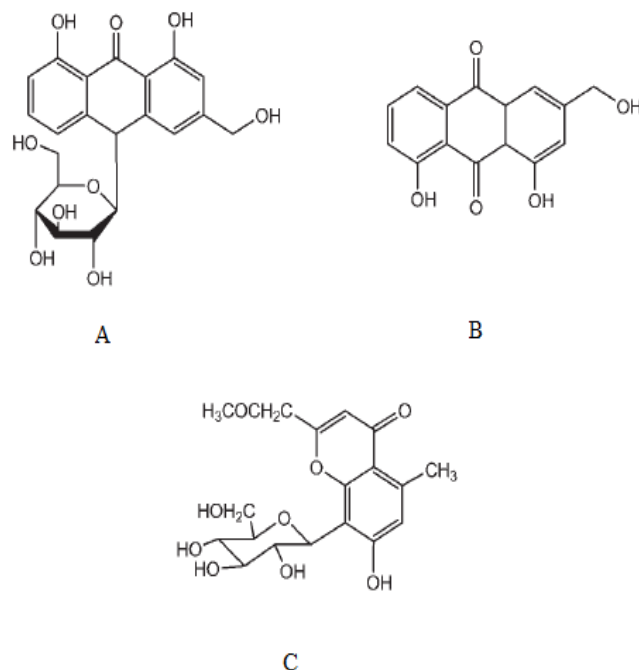


Fig. 10 – Estruturas moleculares dos compostos: A – aloína; B – aloe-emodina; C – aloesina (Harlev et al., 2012).

O espectro de FTIR de CI-XAFC(2) (Anexo 9) apresenta bandas a:

- 3361 cm^{-1} e 3303 cm^{-1} , que correspondem à vibração de estiramento de grupos O-H, indicando a presença de grupos hidroxilo;
- 2924 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} , que correspondem à ligação C=O; 1647 cm^{-1} que corresponde a uma ligação C=O ou corresponde à vibração de estiramento C=C, indicando a presença de carbonilos e/ou alquenos;
- Mas 2853 cm^{-1} pode também corresponder à vibração de estiramento H-C(-O) e 1023 cm^{-1} , que corresponde à vibração de estiramento C-O-C, indicando a presença de grupos éter;
- 1242 cm^{-1} , que corresponde a uma deformação *ip* na ligação C-H de um anel aromático; e as bandas entre 650-900 cm^{-1} , que correspondem a uma deformação *oop* na ligação C-H de um anel aromático, indicando assim, a presença de anéis aromáticos (Pretsch et al., 2009).

A informação obtida é insuficiente para determinar o composto em análise, no entanto o espectro de FTIR apresenta muitas semelhanças com o espectro de FTIR do extracto de XAFC, o que é uma confirmação adicional de que este será o composto maioritário.

3.13. Análise por RMN do composto CI-XAFC(2), isolado do extracto de XAFC por TLC preparativa

O composto CI-XAFC(2), foi isolado por TLC preparativa e comprovada a sua pureza por TLC analítica. Nas figuras 11 e 12 são apresentados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

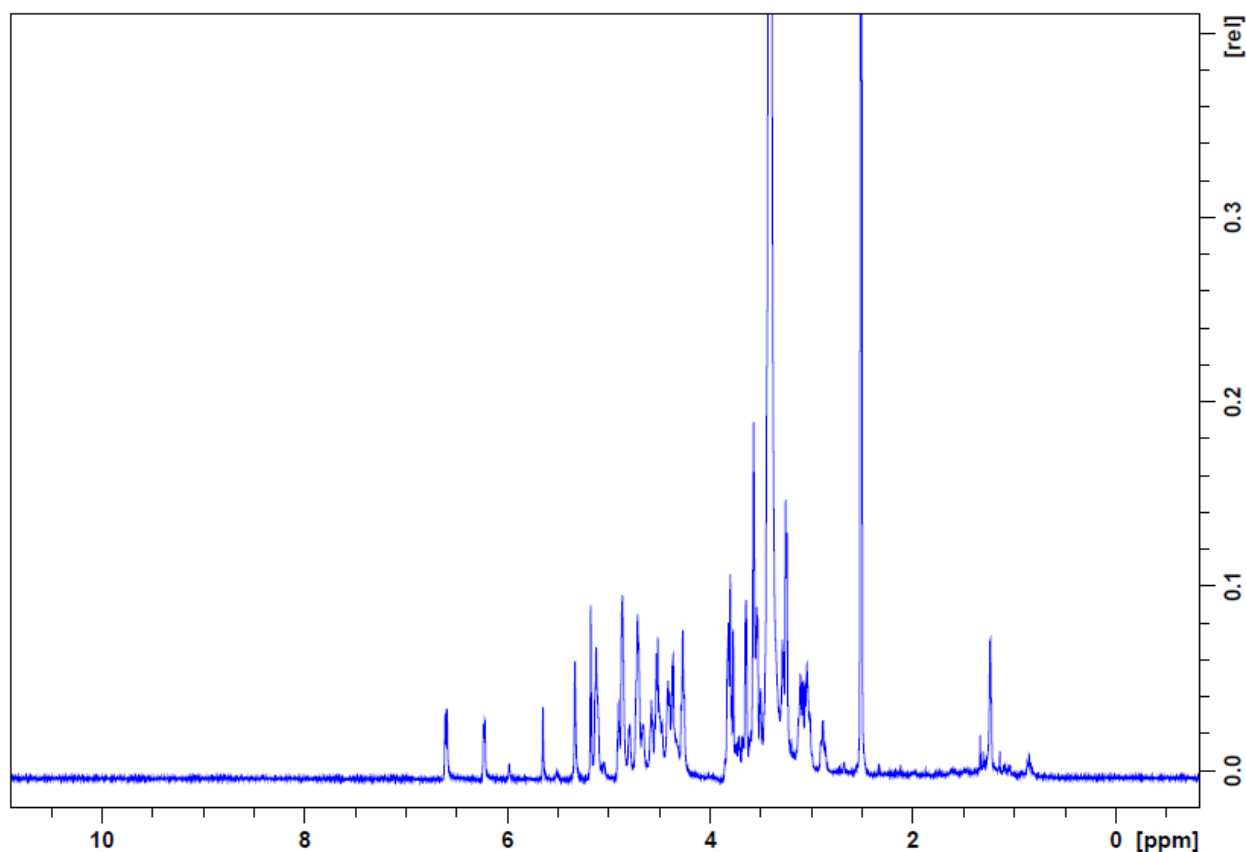


Fig. 11 – Espectro de protão, ^1H , do composto CI-XAFC (2) obtido por TLC preparativa.

Comparando o espectro obtido com a descrição do espectro de *Aloé* descrito por Dagne e Alemu, 1991, verifica-se a existência de semelhanças num composto que corresponde à

aloína. Em que ao analisar o espectro de protão, ^1H , do composto isolado, encontrámos vários sinais: 6,6 ppm, 5,1 ppm, 4,6-4,8 ppm, 2,5-3,5 ppm que correspondem respectivamente aos protões aromáticos da aloína, ao protão anomérico da ramnose, ao metileno hidroxilado da aloína e aos protões de unidades glicosídicas.

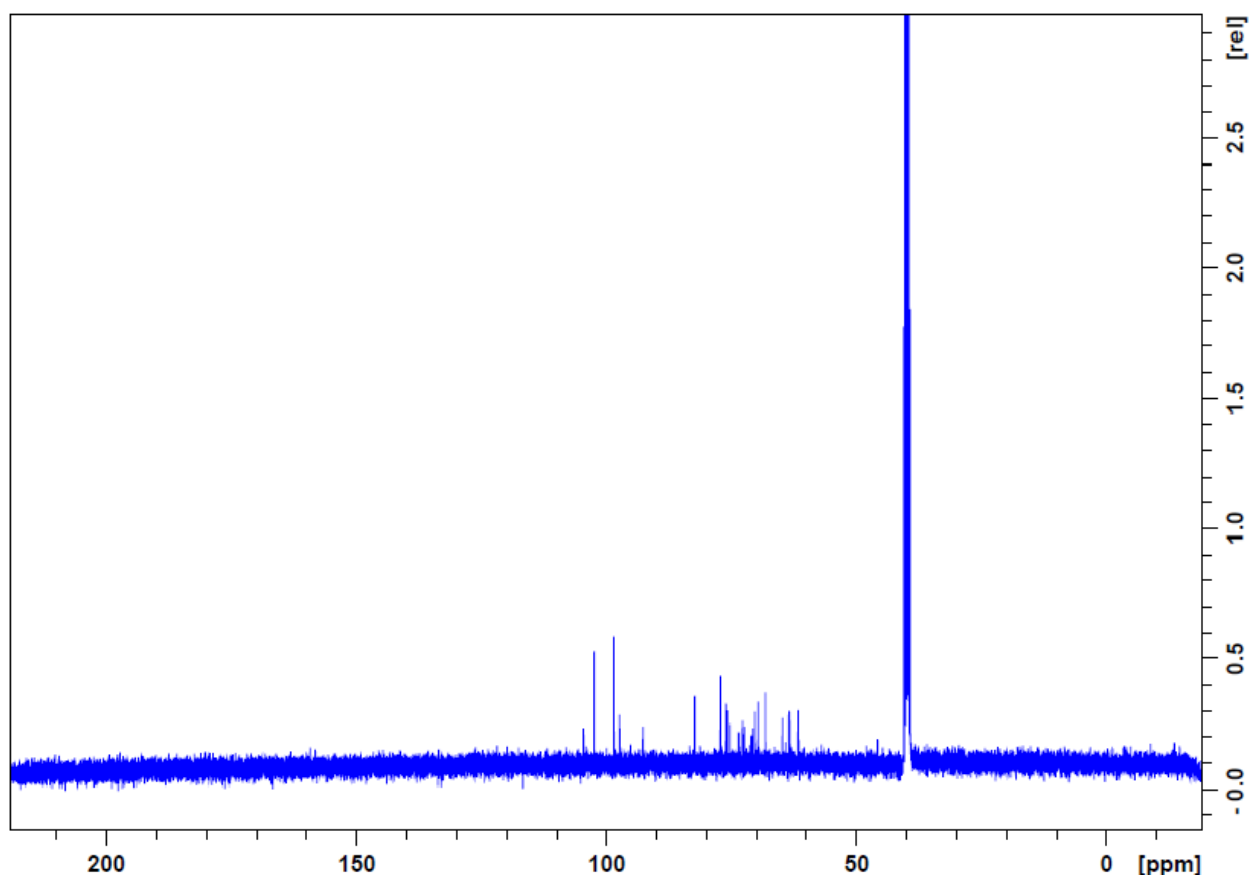


Fig. 12 – Espectro de protão, ^{13}C , do composto CI-XAFC (2) obtido por TLC preparativa.

Em relação ao espectro de carbono, ^{13}C , do composto isolado, este apresenta vários sinais nos seguintes intervalos: 117-160 ppm, 67-84 ppm, 68 ppm e 40 ppm que podem corresponder, respectivamente, a carbonos dos anéis aromáticos da aloína, a unidades glicosídicas, a CH e ao carbono 10 da estrutura da aloína, segundo a mesma literatura mencionada no parágrafo anterior. Desta forma, pensamos que estamos perante uma aloína glicosilada e temos como objectivo futuro investigar melhor este composto de maneira a identificar inequivocamente a sua estrutura.

3.14. Teste da actividade quelante do Fe(II) aos compostos isolados por TLC preparativa

Foi testada, a uma concentração de 90 µg/mL, a actividade quelante do Fe(II) dos compostos CI-XAFC(1) e CI-XAFC(2), isolados por TLC preparativa. No entanto, não se observou qualquer actividade, o que pode estar relacionado com a baixa concentração de composto em que foi realizado o teste.

3.15. Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II) aos compostos isolados por TLC preparativa

Foi testada a capacidade dos compostos isolados de inibirem a redução do Fe(III) a Fe(II). Os valores são apresentados em equivalentes de ácido ascórbico na Tabela 11.

Tabela 11 – Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II), relativamente aos dois compostos isolados por TLC preparativa.

Amostra em estudo	Teste da inibição da redução do Fe(III) a Fe(II)
	mg EAA/mg composto isolado
CI-XAFC (1)	0,474±0,001
CI-XAFC (2)	0,439±0,001

Desta forma verifica-se que os compostos isolados têm actividade de inibição na redução do Fe(III) a Fe(II) e que esta apresenta um valor muito satisfatório.

Capítulo IV

Conclusão

4.1. Conclusão

Neste estudo pretendia-se avaliar várias bioactividades do xarope preparado pelos Frades Franciscanos com o objectivo de saber se haveria algum fundamento científico para a sua utilização (tabela resumo de resultados no Anexo 10). Para tal preparou-se extractos de acetona e *n*-butanol. Ambos os extractos apresentaram moderada actividade antioxidante através dos testes de DPPH e β -caroteno/ácido linoleico; valores moderados quando efectuada a determinação de compostos fenólicos totais, razoável poder quelante do Fe(II) e uma satisfatória actividade de inibição de redução do Fe(III) a Fe(II).

O extracto de acetona mostrou a capacidade de inibir o enzima α -glicosidase e o enzima COX-1, demonstrando que tem actividade hipoglicémica e anti-inflamatória, respectivamente. A salientar ainda que, segundo a literatura, a inibição do α -glicosidase ajuda a prevenir o aparecimento de carcinomas e doenças degenerativas (Lee et al., 2011) e a inibição do COX-1 previne a proliferação de células cancerígenas (Daikoku et al., 2006).

O extracto de acetona apresenta também uma diminuição da viabilidade celular das células do carcinoma mamário humano da linhagem MCF7, o que significa que tem actividade suficiente para eliminar este tipo de células.

Foi preparado um xarope no laboratório seguindo a receita fornecida pelos Frades Franciscanos e avaliada a sua actividade antioxidante pelos mesmos testes, tendo-se verificado que os resultados são semelhantes, excepto na actividade quelante onde se observou que o xarope preparado em laboratório apresenta actividade superior ao do xarope dos Frades. Pensa-se que tal seja devido à possível diferença de concentração dos compostos bioactivos presentes na planta, e que são responsáveis pela actividade quelante. Há que ter em atenção que a planta, o *A. vera*, foi colhida em dias diferentes do ano, bem como num local diferente.

Como conclusão geral, pode-se afirmar que os resultados apresentados para o xarope dos Frades estão de acordo com a utilização para o fim a que se destina e que a preparação caseira de um xarope, de acordo com a receita fornecida, tem propriedades semelhantes.

4.2. Perspectivas futuras

Neste trabalho isolou-se ainda um composto, CI-XAFC(2), que é um dos componentes maioritários do extracto de XAFC por TLC preparativa. No futuro pretendemos identificar inequivocamente a estrutura deste composto e avaliar as propriedades antioxidantes e inibidora dos enzimas α -glicosidase e COX-1 para verificar se será este o composto responsável pela actividade do extracto.

Referências

Abebe W. *An overview of herbal supplement utilization with particular emphasis on possible interactions with dental drugs and oral manifestations.* J Dent Hyg, 2003, 77, 37–46.

Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M. *Antioxidant activities and total phenolic of different types of honey.* Nutrition Research, 2002, 22, 1041–1047.

Alves, C. Q., David, J.M., David, J.P., Bahia, M.V., Aguiar R.M. *Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos,* Quim. Nova, 2010, 33, 10, 2202-2210.

Andrade-Cetto, A, Becerra-Jiménez, J., Cárdenas-Vázquez, R. *Alfa-glucosidase inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes.* Journal of Ethnopharmacology, 2008, 116, 27–32.

Araújo P., et al. *Micropropagação de babosa (Aloe vera – liliaceae),* Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 2002, n.º 25, março/abril, 54-57.

Arosio B., Gagliano N., Fusaro L.M., Parmeggiani L., Tagliabue J., Galetti P., De Castri D., Moscheni C., Annoni G. *Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride.* Pharmacol Toxicol., 2000, 87, 229–233.

Asano, N. *Sugar-mimicking glycosidase inhibitors: bioactivity and application.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2009, 66, 1479-1492

Beil A., Rauwald H. W. *Direct Cytochemical Characterization of Phenolic-Storing Idioblasts in Aloe Species Combining Micromanipulation and HPLC,* Naturwissenschaften, Springer-Verlag, 1993, 80, 315-317.

Beil, A., Rauwald, H. W. In *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, R. Hänsel, K. Keller, H. Rimpler, G. Schneider, eds., Berlin: Springer, 1992, Vol. 4, 209.

Beppu, H., Nagamura Y., Fujita K. *Hypoglycemic and Anti-diabetic Defects of Aloe Arborescens Miller var. Natalensis Berger*, *Phytother. Res.*, 1993, 7, S37.

Bertonceli J., Dobers_ek U., Jamnik M., Golob T. *Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey*. *Food Chem.*, 2007, 105, 822–8.

Biesaga M., Pyrzyńska K. *Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods*. *Food Chemistry*, 2013, 136, 46–54.

Caldeira I., Anjos O., Portal V., Belchior A.P., Canas S. *Sensory and chemical modifications of wine-brandy aged with chestnut and oak wood fragments in comparison to wooden barrels*. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 660, 43–52.

Canas, S., Casanova, V., Belchior, A.P. *Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies*. *Journal of food composition and analysis*, 2008, 21, 8.

Chang X.L., Chen B.Y., Feng Y.M. *Water-soluble polysaccharides isolated from skin juice, gel juice and flower of Aloe vera Miller*, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2011, 42, 197-203.

Chinthalapally V., Dhimant D., Barbara S., Nalini K., Shantu A., Bandaru R. *Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon*. *Cancer Res.*, 1993, 53, 4182–8.

Choi, S., Chung, M-H. *A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects*. Semin. Integr. Med. 2003, 1, 53-62.

Cooke W.T. *Laxative abuse*. Acta Gastro-Enterol Belg., 1981, 44, 448–458.

Crofford, L.J. *COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predications*. The Journal of Rheumatology – Supplement, 1997, 49, 15-19

Cullen, L., Kelly, L., Connor, S. O., Fitzgerald, D. J. *Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition by Nimesulide in Man*. The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics, 1998, 287, 2, 578–582.

Dagne, E., Alemu, M. *Constituents of the leaves of four Aloe species from Ethiopia*. Bull. Chem. Soc. Ethiop., 1991, 5(2), 87-91.

Dagne, E., Bisrat, D., Viljoen, A., Van Wyk, B-E. *Chemistry of Aloe species*. Curr. Org. Chem., 2000, 4, 1055-1078.

Daikoku, T., Tranguch, S., Trofimova, I.N., Dinulescu, D.M., Jacks, T., Nikitin, A.Y., Connolly, D.C., Dey, S.K. *Cyclooxygenase-1 Is Overexpressed in Multiple Genetically Engineered Mouse Models of Epithelial Ovarian Cancer*. Cancer Res., 2006, 66, 2527-2531.

Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Oinonen, P.P., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R. *Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (Melissa officinalis L.) extract*, LWT, 2008, 41, 391–400.

Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., Bekhradnia, A.R. *Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran*. African Journal of Biotechnology, 2008, 7, 18, 3188-3192.

Escriche I., Visquert M., Juan-Borrás M., Fito P. *Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey*. Food Chemistry, 2009, 112, 329–338.

Escuredo, O., Silva, L., Valentão, P., Seijo, M.C., Andrade, P.B. *Assessing Rubus honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity*. Food Chemistry, 2012, 130, 671–678.

Femenia, A., Sánchez E. S., Simal S., Rossello L. *Compositional Features of Polysaccharides from Aloe Vera (Aloe Barbadensis Miller) Plant Tissues*, Carbohydr. Polym., 1999, 39, 109-117.

Filgueiras, C.T., Soares, A.L., Shimokomaki, M., Ida, E.I. *Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho*. Quim. Nova, 2009, 32, 7, 1787-1791.

Fosslien E. *Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia*. Ann Chin. Lab. Sci., 2000, 30, 1, 3-21.

Gheldof, N., Engeseth, N.J. *Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples*. J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 3050-3055.

Gyamfi, M.A., Yonamine, M., Aniya, Y. *Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana Thonningia sanguinea on experimentally-induced liver injuries*. General Pharmacology, 1999, 32, 661–667.

Grover, J. K., Yadav, S., Vats, V. *Medicinal plants of India with anti-diabetic potential*. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 81, 81-100.

Harlev E., Nevo E., Lansky E.P., Ofir R., Bishayee A. *Anticancer potential of aloes: antioxidant, antiproliferative, and immunostimulatory attributes*. *Planta Med.*, 2012, 78, 843–852.

Holandino, C., Veiga, V.F., Rodrigues, M.L., Morales, M.M., Capella, M.A.M., Alviano, C.S. Direct current decreases cell viability but not P glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukaemic cell. *Bioelectromagnetics*, 2001, 22, 470-478.

Hou, D.Y., Hui, R.H., Li, T.C., Guan C.X. *Study on Volatile Constituents of the flowers from Aloe Vera by Gas Chromatography-mass Spectrometry*, *J. Chinese Mass Spectrom. Soc.*, 2003, 24, 456.

Hu, Y., Xu J., Hu Q., *Evaluation of antioxidant potential of Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) extracts*, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51 (26), 7788-7791.

Jaganathan S.K. *Can flavonoids from honey alter multidrug resistance*. *Medical Hypotheses*, 2011, 76, 535–537.

Jeddar A., Khassany A., Ramsaroop V.G., Bhamjei I.E., Moosa A. *The antibacterial action of honey: an in vitro study*. *S. Afr. Med. J.*, 1985, 67, 257–9.

Khadri, A., Neffati, M., Smiti, S., Falé, P., Lino, A.R.L., Serralheiro, M.L.M., Araújo, M.E.M. *Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of Cymbopogon schoenanthus L. Spreng (lemon grass) from Tunisia*. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, 43, 331-336.

Lee, D., Kim, S., Kim, D., Kim, J. H., Park, S. P., Ryu, Y., Kim, M., Cho, S. K., Riu, K. Z., Lee, D. *Screening of Phellinus linteus, a Medicinal Mushroom, for Anti-viral Activity*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 2011, 54(3), 475-478

Lee K., Weintraub S., Yu B., Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*, *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, 28, 2, 261-265.

Lima A.R., Pereira, R.G.F.A., Abrahão S.A., Duarte, S.M.S., Paula, F.B.A. *Compostos bioativos do café: actividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. Quim. Nova*, 2010, 33, 1, 20-24.

Maree, A. O., Curtin, R. J., Chubb, A., Dolan, C., Cox, D., O'brien, J., Crean, P., Shields, D. C., Fitzgerald, D. J. *Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2005, 3, 2340–2345.

Mascolo N., Izzo A.A., Borelli F., Capasso R., DiCarlo G., Sautebin L., Capasso F. *Healing powers of aloes*. In: T. Reynolds ed. *Aloes: The Genus Aloe*, 2003 edition, Boca Raton, FL: CRC Press, 2004, Vol. 38, 209–238.

Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araújo, M.E.M. *Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices*. *Food Chemistry*, 2007, 103, 778–786.

Mueller S.O., Eckert I., Lutz W.K., Stopper H. *Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloe-emodin and danthron in mammalian cells: topoisomerase II mediated?* *Mutat Res.*, 1996, 371, 165–173.

Ni, Y., Tizard, I.R. *Analytical methodology: the gel-analysis of aloe pulp and its derivatives*. In *Aloes The Genus Aloe*; Reynolds, T., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 2004, 111- 126.

Ni Y., Turner D., Yates K.M., Tizard I. *Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L. leaf pulp*. *Int Immunopharmacol* 2004, 4, 1745–1755.

Olatunya O.S., Olatunya A.M., Anyabolu H.C., Adejuyigbe E.A., Oyelami O.A., Preliminary Trial of Aloe Vera Gruel on HIV Infection. *J Altern Complement Med.*, 2012, 18 (9), 850-3.

Pecere T., Gazzola M.V., Mucignat C., Parolin C., Vecchia F.D., Cavaggioni A., Basso G., Diaspro A., Salvato B., Carli M., Palu G. *Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors*, *Cancer Res.*, 2000, 60, 2800–2804.

Pérez, R.A. *Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 2633-2637.

Pretsch, E., Bühlmann, P., Badertscher, M. *Structure determination of organic compounds – tables of spectral data*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009, 4th. Completely Revised Edition.

Rufino, M.S.M, Alves, R.E., Brito, E.S., Morais, S.M., Sampaio, C.G., Pérez-Jiménez J., J.P., Saura-Calixto F.D. *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH*. Embrapa, 2007, Comunicado Técnico 127.

Santos, L.C., Piacente, S., Montoro, P., Pizza, C., Vilegas, W. *Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de Leiothrix (Eriocaulaceae)*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2003, 13, 2, 67-74.

Schmidt, L., Marmitt S., Oliveira E., Souza C. *Características físico-químicas de aguardentes produzidas artesanalmente na região do Vale do Taquari no Rio Grande do Sul*. *Alim. Nutr.*, 2009, 20, 4, 539-551.

Siegers C.P. von Hertzberg-Lottin E., Otte M., Schneider B., *Anthranoid laxative abuse—a risk for colorectal cancer?* *Gut*, 1993, 34, 1099–1101.

Singh B., Sharma V., Dhiman A., Devi M. *Design of Aloe Vera-Alginate Gastroretentive Drug Delivery System to Improve the Pharmacotherapy*, Polymer-Plastics Technology and Engineering, 2012, 51: 1303–1314.

Singleton, V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós, R.M. *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent*. Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants Part A, 1999, 299, 152–178.

Souza Filho, A.P.S, Santos, R.A., Santos, L.S., Guilhon, G.M.P, L.S., Santos, A.S., Arruda, M.S.P., Muller, A.H., Arruda, A.C. *Potencial alelopático de myrcia guianensis*. Planta Daninha, Viçosa-MG, 2006, 24, 4, 649-656.

Stuart, A.R., Gulve, E.A., Wang, M. *Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes*. Chemical Reviews, 2004, 104, 1255–1282.

Swellam T., Miyanaga N., Onozawa M., Hattori K., Kawai K., Shimazui T., Akaza H. *Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: In vivo and in vitro studies*. International Journal of Urology, 2003, 10, 213–219.

Takahashi M., Konaka D., Sakamoto A., Morikawa H. *Nocturnal uptake and assimilation of nitrogen dioxide by C3 and CAM plants*. Z Naturforsch, 2005, 60, 279–284.

Terrab, A., González, M.L., González, A.G., Díez, M.F., Escudero, M.L., Heredia, F.J. *Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis*. Eur. Food Res. Technol., 2003, 218, 88-95.

Tomasin R., Gomes-Marcondes M.C.C. *Oral administration of Aloe vera and Honey reduces walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumor tissue*. Phytother. Res., 2011, 25, 619-623

Uttara¹, B., Singh, A.V., Zamboni, P., Mahaja, R.T. *Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options*. Current Neuropharmacology, 2009, 7, 65-74.

Vogler B.K., Ernst E., *Aloe vera: a systematic review of its clinical effectiveness*. Br J Gen Pract., 1999, 49, 823-828.

Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F., Martos, I., Singanusong, R. *Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand Leptospermum honeys*. Food Chemistry, 2003, 81, 159-168.

Yin, J. Z., Zhou L. X., Wu S. X., Wang Q., Zhou J. Y. *Analysis of Nutrient Composition in Aloe Flower in Yuanjiang, Yuannan Province*, Pr. Prev. Med., 2003, 10, 13.

Zhang, Z.T., Du, Y.J., Liu, Q.G., Liu, Y. *Determination of the antioxidative effect of Aloe vera*. Nat. Prod. Res. Dev., 2001, 13, 45-46.

Zonta, F.; Bogoni, P.; Masotti, P., Micali, G. *High-performance liquid chromatographic profiles of aloe constituents and determination of aloin in beverages, with reference to the EEC regulation for flavouring substances*. J. Chromatogr. A., 1995, 718, 99-106.

<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=ALVE2> – página visitada a 16/08/2013

www.guiadanutricao.com – página visitada a 16/08/13

<http://structuresearch.merckchemicals.com/cgi-bin/getStructureImage.pl?owner=EMD&unit=BIO&product=648471> – página visitada a 17/09/13

Anexos

Anexo 1

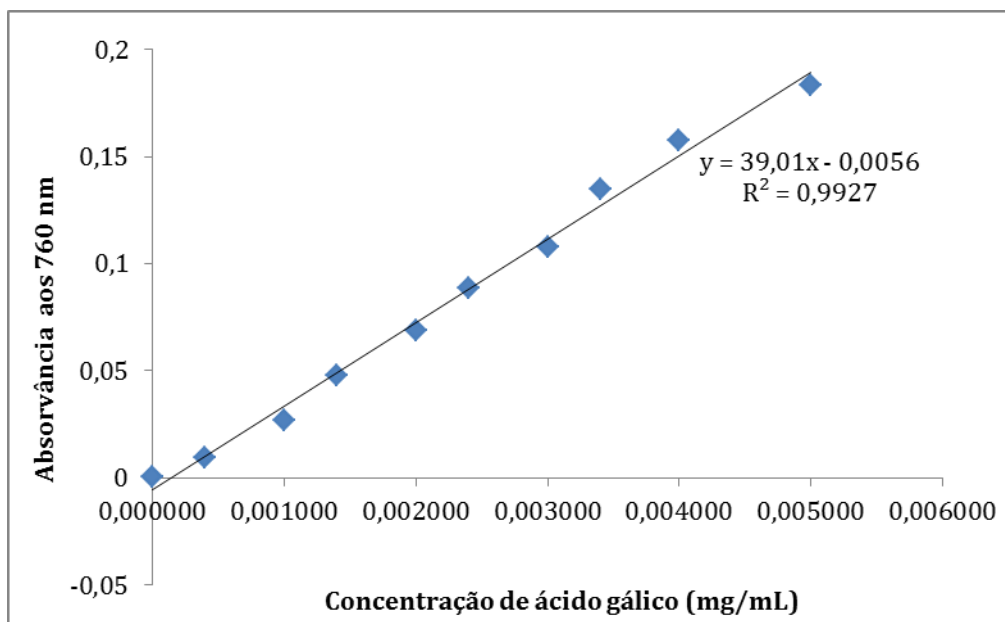


Gráfico 1 – Curva de calibração de ácido gálico para o teste de determinação de compostos fenólicos totais.

Anexo 2

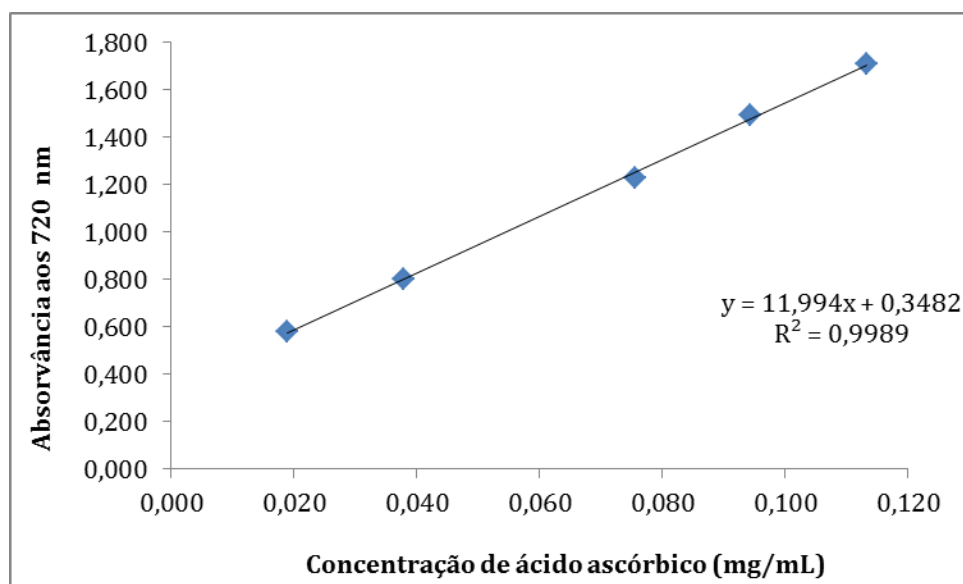


Gráfico 2 – Curva de calibração de ácido ascórbico para o teste de inibição da redução do Fe(III) a Fe(II).

Anexo 3

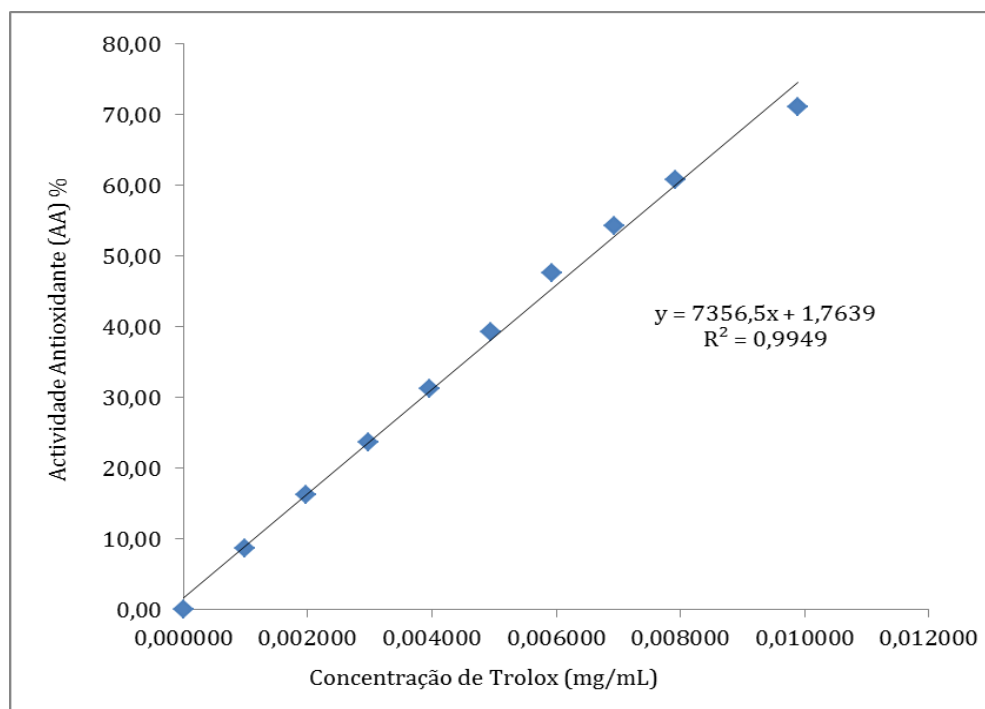


Gráfico 3 – Concentração de Trolox versus actividade antioxidante (%).

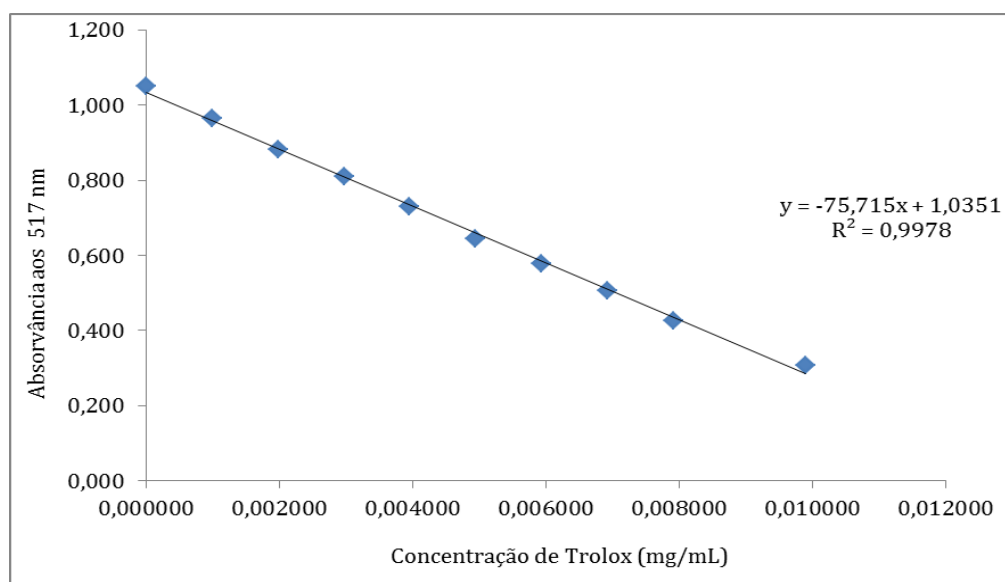


Gráfico 4 – Curva de calibração de Trolox para o teste de avaliação da actividade antioxidante do DPPH.

Anexo 4

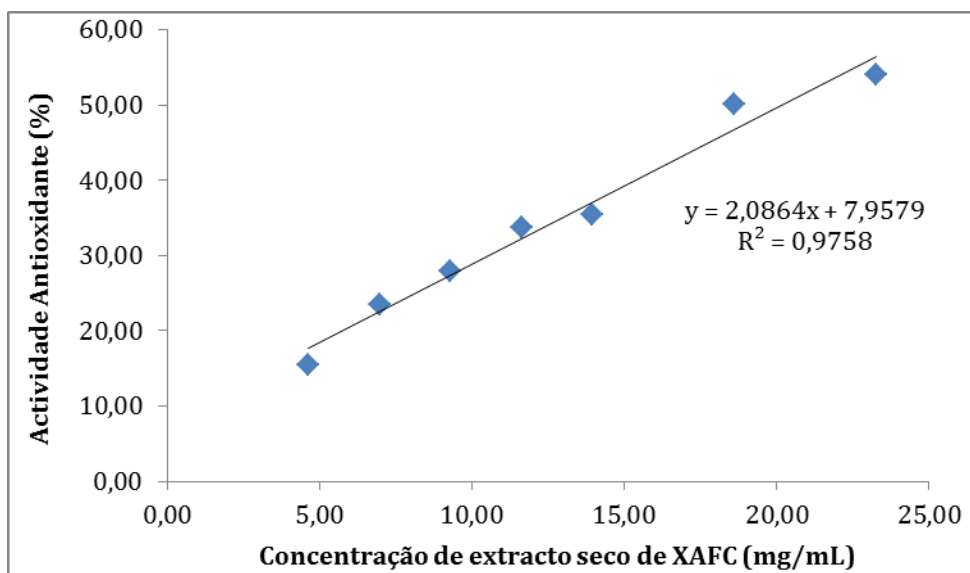


Gráfico 5 – Determinação do IC₅₀ da actividade quelante do extracto de XAFC.

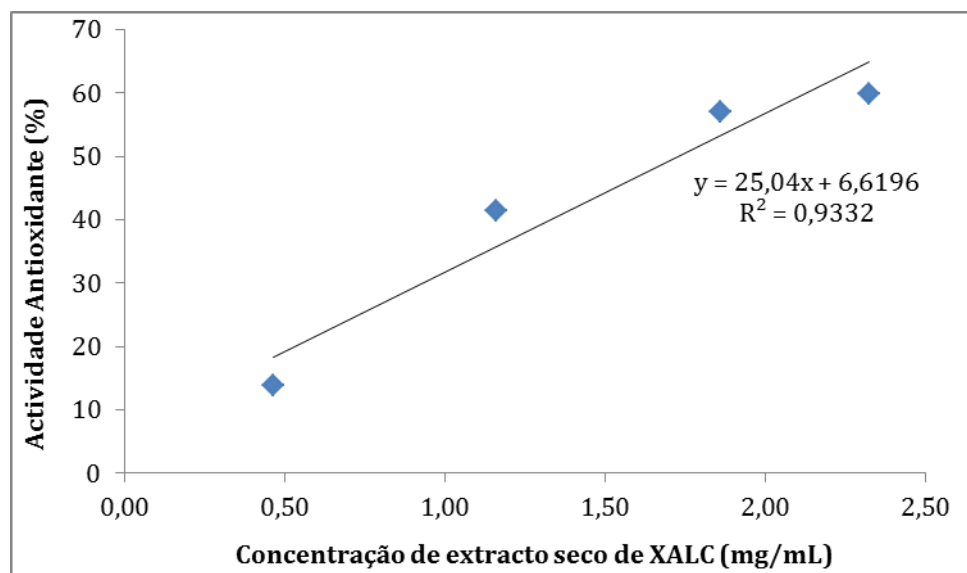


Gráfico 6 – Determinação do IC₅₀ da actividade quelante do extracto de XALC.

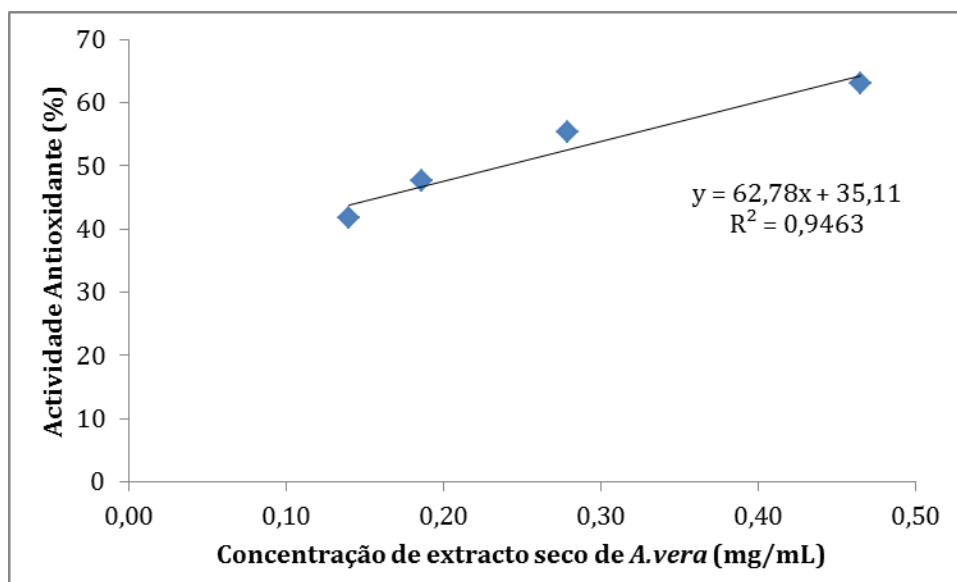


Gráfico 7 – Determinação do IC₅₀ da actividade quelante do extracto de *A. vera*.

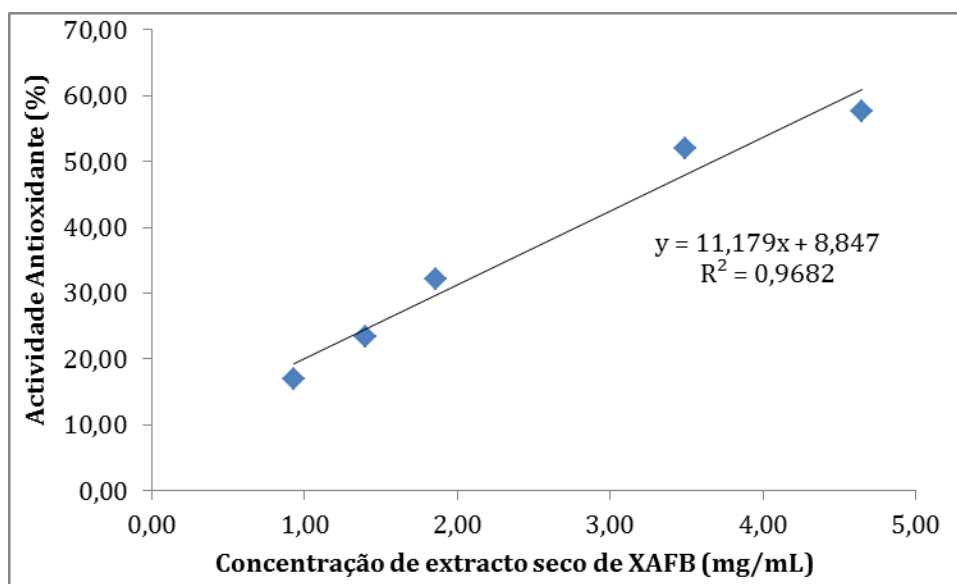


Gráfico 8 – Determinação do IC₅₀ da actividade quelante do extracto de XAFB.

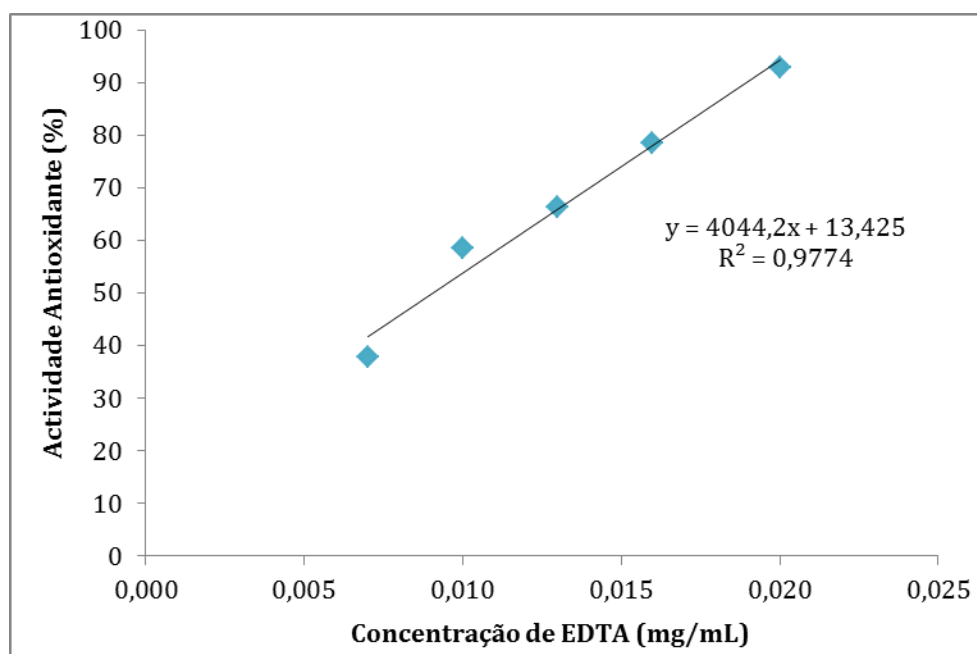


Gráfico 9 – Determinação do IC₅₀ da actividade quelante do EDTA.

Anexo 5

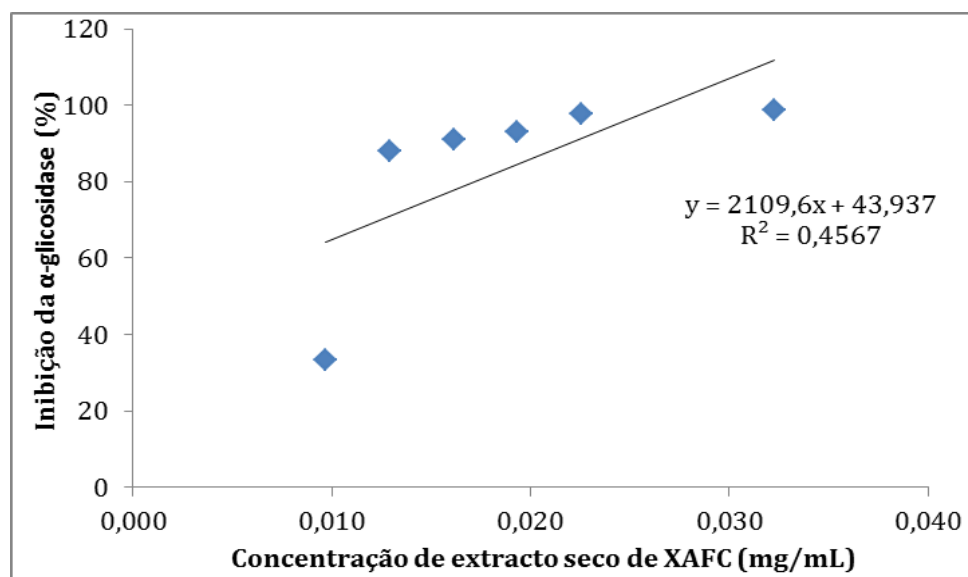


Gráfico 10 – Inibição da α -glicosidase versus concentrações de extracto seco de XAFC.

Anexo 6

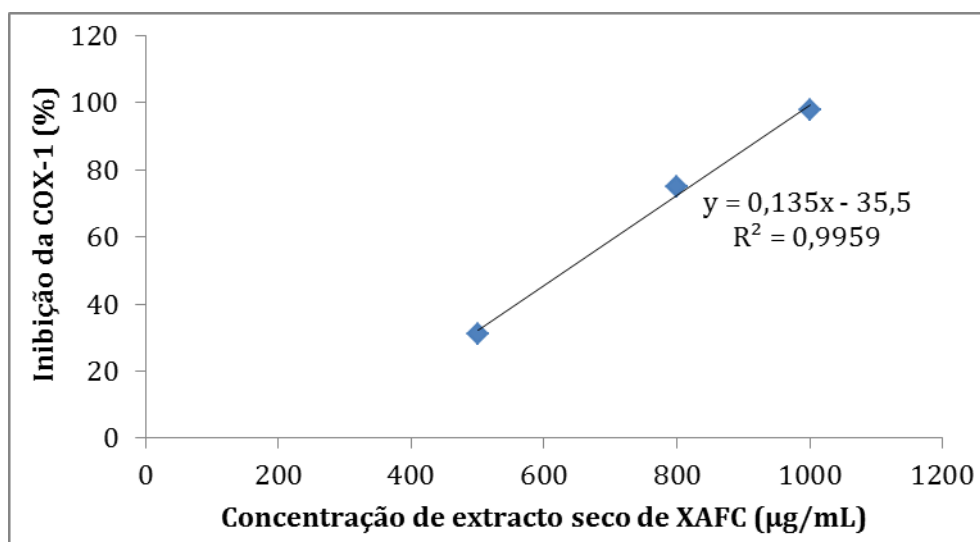


Gráfico 11 – Inibição da COX-1 versus concentrações de extracto seco de XAFC.

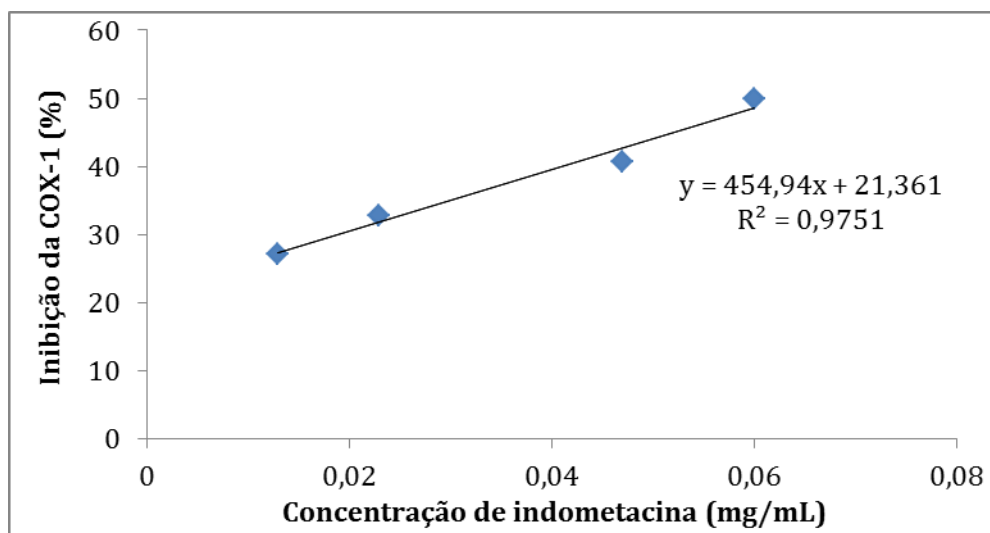


Gráfico 12 – Inibição da COX-1 versus concentrações de indometacina.

Anexo 7

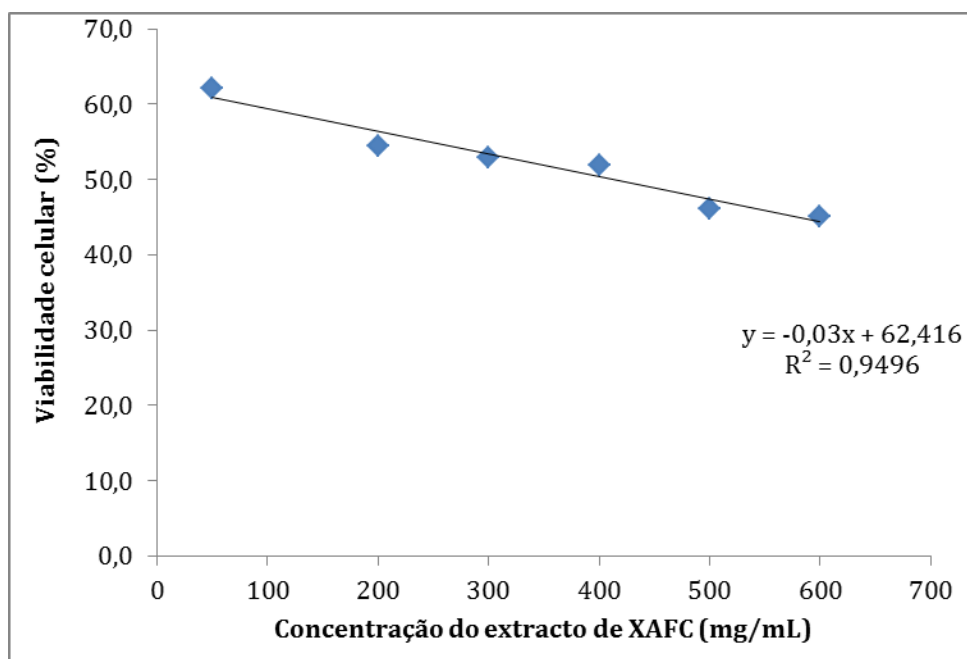
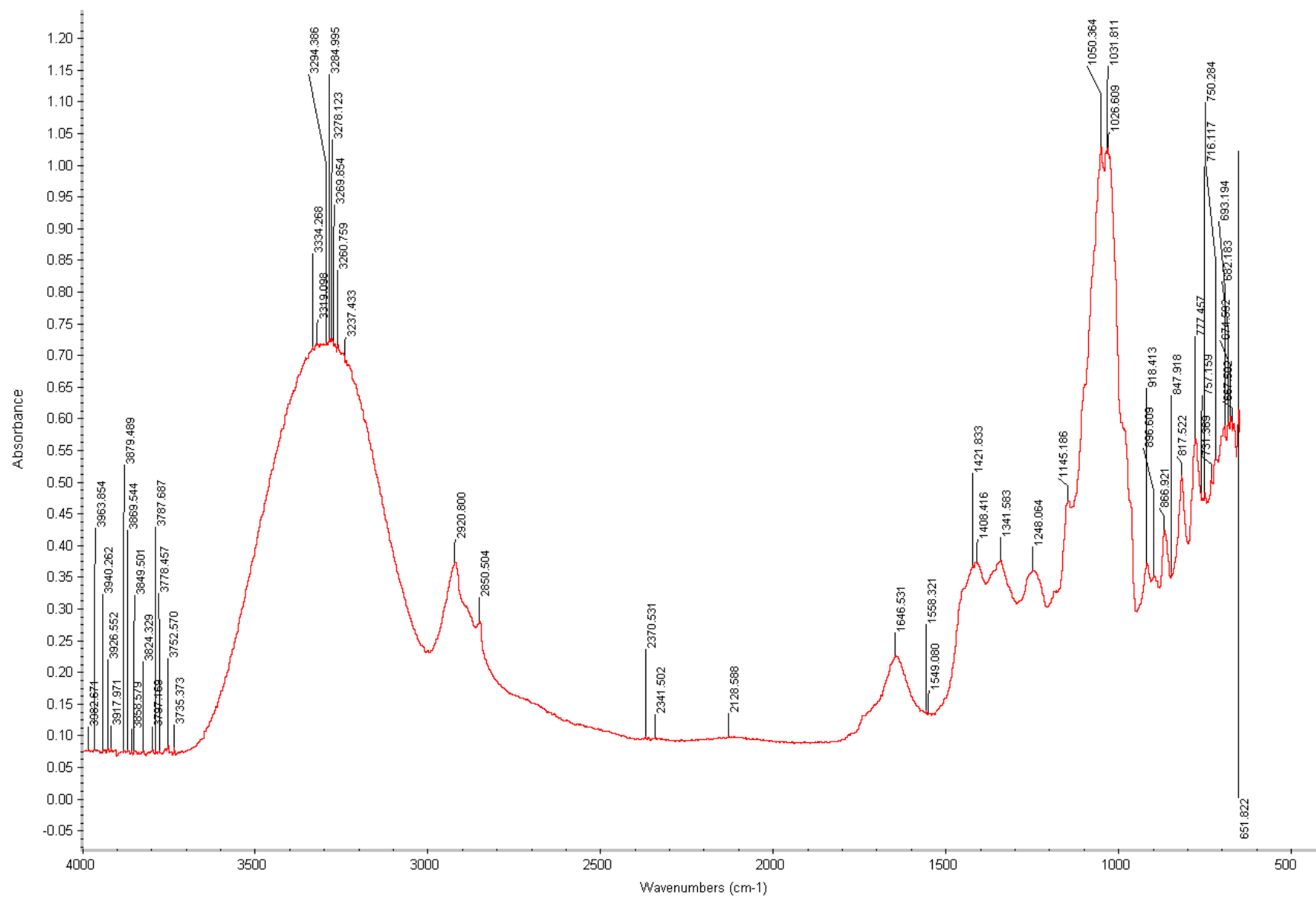


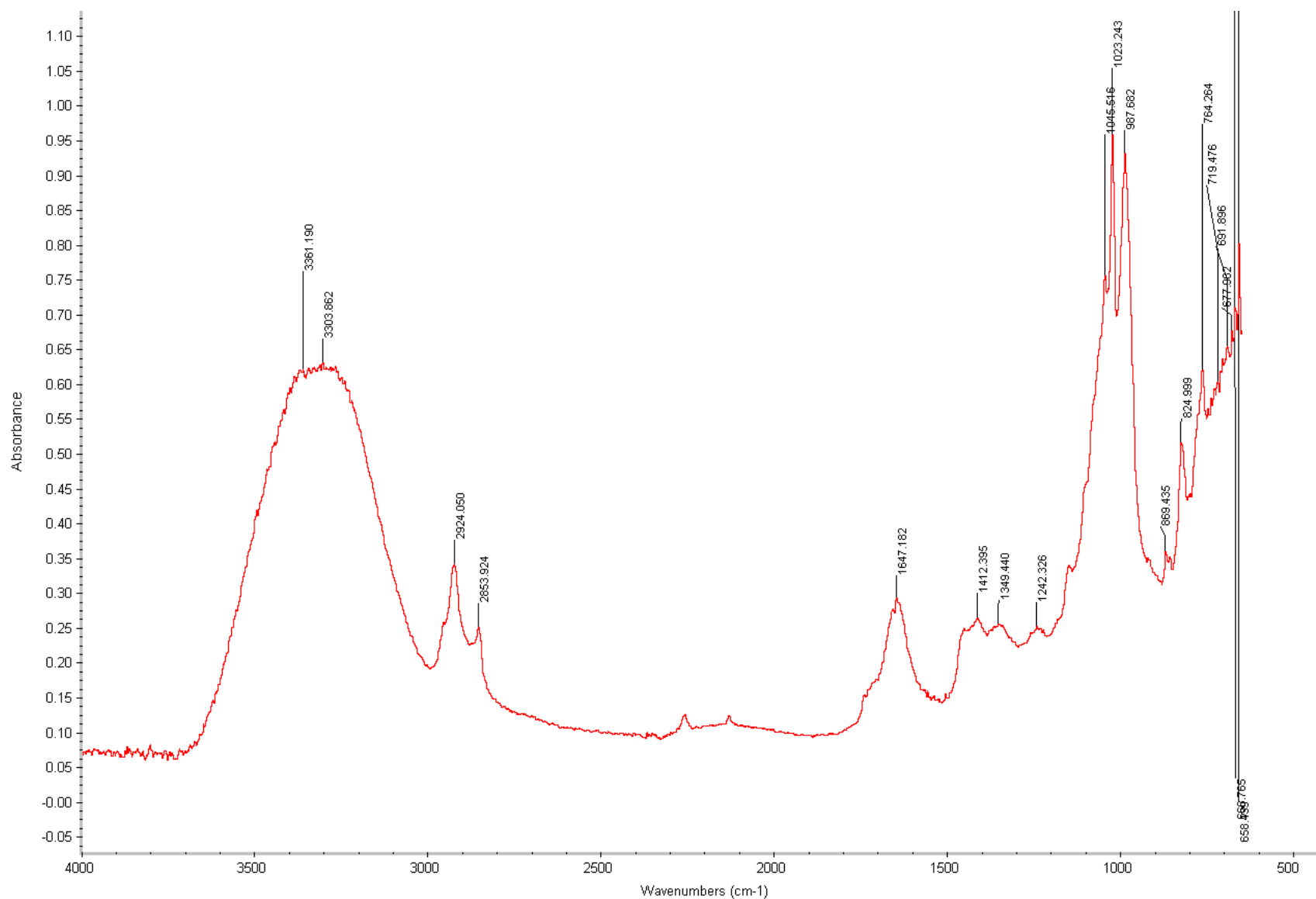
Gráfico 13 – Viabilidade celular em células do carcinoma mamário humano da linha MCF7 versus concentrações do extracto de XAFC.

Anexo 8



Espectro de FTIR do extracto de XAFC antes da TLC preparativa.

Anexo 9



Espectro de FTIR do composto IC-XAFC(2) isolado por TLC preparativa.

Anexo 10

Tabela resumo dos resultados dos testes realizados aos diferentes extractos secos

	Extractos de Acetona					Extrato de Butanol	Sem extração
	Xarope de <i>Aloé</i> Frades	Resíduos de <i>Aloé</i> do xarope Frades	Xarope de <i>Aloé</i> Laboratório	<i>Aloé</i> Vera	Mel	Xarope de <i>Aloé</i> Frades	Aguardente (40% V/V)
DPPH	0,5±0,1 µg Trolox/mg dry extract	0,3±0,1 µg Trolox/mg dry extract	0,6±0,1 µg Trolox/mg dry extract	13,5±0,6 µg Trolox/mg dry extract	4,2±0,3 µg Trolox/mg dry extract	1,0±0,2 µg Trolox/mg dry extract	n.a.
β-caroteno/ác. Linoleico (%)	72,63±4,16	-	-	-	-	51,92±5,49	-
Determinação de Compostos Fenólicos Totais	1,61±0,18 µg EAG/mg dry extract	1,64±0,22 µg EAG/mg dry extract	1,31±0,0 µg EAG/mg dry extract	964,71±0,01 µg EAG/mg dry extract	5,73±0,29 µg EAG/mg dry extract	1,01±0,45 µg EAG/mg dry extract	80,87±0,87 µg EAG/mg dry extract
Actividade Quelante do Fe (II) (IC ₅₀ %)	20,15±1,90 mg.mL ⁻¹	n.a.	1,73±0,61 mg.mL ⁻¹	0,24±0,10 mg.mL ⁻¹	n.a.	3,68±0,89 mg.mL ⁻¹	(200µL, 171 mg)*
Inibição da Redução de Fe(III) a Fe(II)	0,233±0,009 mg AAE/mg dry extract	0,063±0,008 mg AAE/mg dry extract	0,178±0,005 mg AAE/mg dry extract	0,831±0,011 mg AAE/mg dry extract	0,564±0,013 mg AAE/mg dry extract	0,133±0,005 mg AAE/mg dry extract	n.a.
Inibição do α-glicosidase 0.01mg.mL ⁻¹	33%	-	-	-	-	-	-
Inibição do COX-1 IC ₅₀	0,66±0,05 mg/mL	-	-	-	-	-	-
Viabilidade Celular, IC ₅₀ (linhagem MCF7)	413,87±80,34 µg/mL	-	-	-	-	-	-

n.a. – não tem actividade; * – aguardente puro

